VOLUMEN 6 OCTUBRE-DICIEMBRE 1953 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Fermentación microbiana en el aderezo de las aceitunas verdes, por **Antonio Izquierdo Tamayo** 291

Transformación levadura-bacteria y estudio de los bacilos que resultan de la transformación hongo-bacteria, por **M.ª del Carmen Cándida González Vázquez** 311

Nuevas especies de levaduras aisladas de líquidos curtientes, por **Carlos Ramírez y Jacques Boidin** 405

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

INDICE
del Volumen 6 (1953)

Redacción: Serrano, 113 ó 152
MADRID

INDICE DEL VOLUMEN 6

SUMARIO DEL NUM. 1

Páginas

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Una década de antibióticos en América, por **Kenneth B. Raper** 3

Empleo de los medios sintéticos de Wickerham en los estudios sobre nutrición de los microorganismos, por **Juan Santa María Ledochowski** 39

INFORMACION

Actas de la Sociedad 81

BIBLIOGRAFIA

LUIS E. NAJERA: **Nomenclátor de las enfermedades transmisibles y simili-transmisibles** 83

HANS VOGEL: **Mikrobiologie im Reagenzglas** 85

Directory of collections and list of species maintained in New Zealand 85

Indice de artículos de revistas 86

SUMARIO DEL NUM. 2

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Observaciones sobre la influencia del ión Br en los virus vegetales, por **Félix Martínez Cordón** 117

Método sencillo para obtención de actinomicina, por **O. Gonçalves Lima** y **A. Sánchez-Marroquín** 127

Aprovechamiento industrial de los subproductos del arroz. V. Aclimatación de levaduras sobre caldos de prehidrólisis de cascarilla, por **J. M.ª Viguera Lobo, A. Casas Carramiñana** y **E. Primo Yúfera** 129

Nuevo método para determinar los síntomas precoces de virosis en las plantas, por **Miguel Rubio Huertos** 149

Páginas

INFORMACION

VI Congreso Internacional de Microbiología 159
Actas de la Sociedad 160

BIBLIOGRAFIA

R. DOERR: **Las investigaciones sobre inmunidad** 163
Milchwissenschaft und Medizin (1952) 164
Indice de artículos de revistas 164

SUMARIO DEL NUM. 3

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Obtención y estudio de las formas filtrables de Proteus vulgaris, por **Miguel Rubio Huertos** y **Rodrigo Moreno San Martín** 195
Algunos datos sobre Streptomyces productores de antibióticos, por **A. Sánchez-Marroquín** 205
Introducción de una modificación al método de Wickerham para determinación cuantitativa de la fermentación de la rafinosa por las levaduras, por **Carlos Ramírez** 227
Una nueva especie de Sporotrichum: El Sporotrichun sanguineum, por **Carlos Ramírez** ... 231
Contribución a la tinción de ascosporas y clamidosporas de levaduras, por **Carlos Ramírez** 239
Estudio sobre nuevas especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos, por **Carlos Ramírez** 249
Estudio de una nueva estirpe de Brassica virus L. y sus inclusiones intracelulares, por **Miguel Rubio Huertos** 255

INFORMACION

Actas de la Sociedad 261

BIBLIOGRAFIA

Indice de artículos de revistas 263

SUMARIO DEL NUM. 4

Páginas

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Fermentación microbiana en el aderezo de las aceitunas verdes, por **Antonio Izquierdo Tamayo** 291

Transformación levadura-bacteria y estudio de los bacilos que resultan de la transformación hongo-bacteria, por **M.ª del Carmen Cándida González Vázquez** 307

Nuevas especies de levaduras aisladas de líquidos curtientes, por **Carlos Ramírez** y **Jacques Boidin** 405

VOLUMEN 6 OCTUBRE-DICIEMBRE 1953 NUM. 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

GRAFICAS TEJARIO, S. A. Plaza del Biombo, 4. Teléfono 22 12 88. MADRID

C. S. I. C.
PATRONATO "JUAN DE LA CIERVA"
INSTITUTO ESPECIAL DE LA GRASA Y SUS DERIVADOS. SEVILLA

FERMENTACION MICROBIANA EN EL ADEREZO DE LAS ACEITUNAS VERDES

por

Antonio Izquierdo Tamayo.

Las aceitunas aderezadas sevillanas sufren una típica fermentación láctica. Como es sabido, son previamente tratadas por lejía, para quitarles el amargor, y después de lavadas son depositadas en bocoyes de madera de castaño con una salmuera de concentración diferente, según la variedad, donde permanecen un tiempo variable y donde los azúcares que contienen sufren una fermentación láctica. Todos los detalles del proceso, así como las transformaciones químicas de la salmuera en el curso de la fermentación, pueden verse en las publicaciones de J. M. R. de la Borbolla y C. Gómez-Herrera (2, 8, 9). Aparte de las bacterias lácticas, las aguas de lavado, las propias con que se elaboran las salmueras, los bocoyes, el polvo, etc., son vehículos de numerosos microorganismos, muchos de los cuales, a más de los que portan las aceitunas y no destruyó la lejía, son capaces de desarrollarse en las salmueras de las aceitunas, siendo en múltiples ocasiones la causa de muchas alteraciones de las mismas. Todo ello hace, pues, sumamente interesante el estudio microbiológico no sólo del proceso fermentativo normal, sino igualmente el de todos los demás organismos asociados, que tan decisivo papel pueden desempeñar en ocasiones.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 10 de noviembre de 1952.

Uno de los estudios microbiológicos más antiguos sobre las aceitunas se debe a H. F. Smyth en 1927 (15); en él se ocupa, principalmente, de los factores que intervienen en la deterioración de las aceitunas durante el cocido, envasado y comercio de las mismas. No obstante, se refiere ya algo a la fermentación láctica que sufren, debida, principalmente, a bacterias, pero posiblemente ayudada y completada por la acción de levaduras. Se refiere después a la alteración llamada «zapatería» y hace también algunas consideraciones sobre la manera de evitar distintas alteraciones.

Pero el estudio más completo realizado sobre el proceso microbiológico de la fermentación de las aceitunas se debe a R. H. Vaughn, H. C. Douglas y J. R. Gilltland, de la Estación Experimental de Agricultura de la Universidad de California (Berkeley) (16). Estos autores hacen, igualmente, un detenido estudio de los cambios químicos de las salmueras y sus observaciones pueden considerarse básicas y punto de partida de todo trabajo posterior.

En la República Argentina han estudiado el proceso del aderezo Aníbal H. Merzari y Jorge S. Molina (11); han aislado también el *Lactobacillus plantarum*, pero, en cambio, hasta ahora, no han encontrado nunca *Leuconostoc mesenteroides*, así como tampoco han aislado lactobacilos heterofermentativos; igualmente han encontrado como causantes de las alteraciones gaseosas (alambrado, fisuras, vejigas, etc.) a bacilos intermediarios tipo II del grupo *coli-aerógenes*, según la clave de Wilson (13 y 14).

En España, M. Martínez, M. Romero y L. Monzón han demostrado también la presencia de lactobacilos en las salmueras, así como de gérmenes *coli-aerógenes* en los comienzos de la fermentación.

ESTUDIO DEL PROCESO MICROBIANO EN LAS SALMUERAS ESPAÑOLAS (SEVILLANAS)

Como pauta general, nos sirvieron de guía los procedimientos recomendados por Vaughn, Douglas y Gililland (16), que hubimos de modificar y adaptar a nuestras especiales condiciones; muy valiosas nos fueron las indicaciones que, en carta particular, nos hizo el ingeniero don Jorge S. Molina, de Buenos Aires (véase también 12 y 13).

1) Marcha del proceso de fermentación.

Fué estudiado, principalmente, en cuatro salmueras de la Casa Brugier y Trujillo, de las cuales se tomaron muestras periódicamente, a partir del segundo día de entrar en ellas las aceitunas. Estas salmueras estaban marcadas con los números 53-M, 57-M, 76-G y 144-G, correspondiendo la M a manzanillas y la G a gordales. Paralelamente a las siembras, les era determinado el pH y la acidez. A continuación damos unos cuadros expresivos de los microorganismos desarrollados.

CUADRO I

SALMUERA 53-M

Días	Acidez total — Grs. %	pH	Microorganismos desarrollados
2	0,00	5,65	Sólo colonias de Gram-negativos y algunos mohos. Algunas colonias de bacilos esporógenos.
3	0,04	5,65	Algunas colonias de *Lactobacillus* y levaduras, pero también algunas de Gram-négativos.
6	0,06	5,65	Gran abundancia de colonias de *Lactobacillus*, que forman una
8	0,10	5,4	verdadera nube en las placas; también son numerosas las colonias de levaduras. Todavía se desarrollan algunas colonias de Gram-negativos.
11	0,17	5,4	Predominio de *Lactobacillus*.
13	0,21	4,95	Abundantes levaduras. Escasos
15	0,22	4,95	Gram-negativos.
17	0,28	4,85	
24	0,36	4,7	Gran abundancia de *Lactobacillus* y levaduras. No se desarrollan
43	0,41	4,55	colonias de Gram-negativos.
57	0,55	4,45	
70	0,56	4,35	
101	0,67	4,40	
131	0,73	4,3	Salmuera estabilizada. Sólo *Lactobacillus* y levaduras.
7 meses.	0,86	4,1	

CUADRO II

SALMUERA 57-M

Días	Acidez total — Grs. %	pH	Microorganismos desarrollados
2	0,00	5,6	Sólo colonias de bacilos Gram-negativos y numerosos mohos. Algunas colonias de bacilos esporulados.
3	0,04	5,7	Algunas escasas colonias de *Lactobacillus;* levaduras. Algunas colonias de Gram-negativos y esporulados.
6	0,07	5,65	Todavía pocos *Lactobacillus;* levaduras y algunas colonias de Gram-negativos.
8	0,10	5,4	El desarrollo de *Lactobacillus* es
11	0,16	5	ya grande. Abundan las leva-
13	0,24	4,85	duras y algunas colonias de
15	0,24	4,85	Gram-negativos.
17	0,30	4,7	
24	0,36	4,7	Dominio de los *Lactobacillus.* Abundantes levaduras. No se
43	0,50	4,4	desarrollan Gram-negativos.
57	0,58	4,4	
70	0,58	4,4	
101	0,65	4,3	
131	0,68	4,2	Salmuera estabilizada. Sólo *Lactobacillus* y levaduras.
7 meses.	0,83	4,05	

CUADRO III

SALMUERA 76-G

Días	Acidez total — Grs. %	pH	Microorganismos desarrollados
2	0.00	5,6	Colonias de bacilos Gram-negativos. Numerosos mohos. Algunas colonias de bacilos esporógenos.
3	0.07	5.55	Algunas colonias de *Lactobacillus*. Levaduras y bacilos Gram-negativos y esporógenos.
6	0,21	4,80	Todavía pocos *Lactobacillus*. Levaduras. Continúan desarrollándose los Gram-negativos.
8	0.28	4.65	Gran abundancia de *Lactobacillus*. También las levaduras son muy abundantes. Colonias de Gram-negativos.
11	0.37	4,40	Predominio de *Lactobacillus*.
13	0,45	4.35	También se desarrollan Gram-negativos y levaduras.
15	0,51	4.25	
17	0,55	4.20	
24	0,70	4,05	Abundantes *Lactobacillus*, aunque menos numerosos que en las
43	0,84	4	salmueras 53-M y 57-M. Levaduras. No se desarrollan bacilos Gram-negativos.
57	0,91	3,95	
70	0,92	3,85	
101	0,97	3,85	Menos *Lactobacillus* que en las
131	1.01	3,85	anteriores y bastante desarrollo de levaduras.
7 meses.	1.06	3,85	

CUADRO IV

SALMUERA 144-G

Días	Acidez total — Grs. %	pH	Microorganismos desarrollados
2	0,00		Sólo bacilos Gram-negativos; algunos esporulados.
3	0,00	7,95	Sólo colonias de Gram-negativos y algunas levaduras.
6	0,09	5,25	Algunas colonias de *Lactobacillus* y levaduras. Bacilos Gram-negativos y esporulados.
8	0,13	4,85	Colonias de *Lactobacillus* y levaduras. Bacilos Gram-negativos. Una colonia de esporulados.
11	0,22	4,6	*Lactobacillus* y levaduras. Algunos Gram-negativos.
13	0,25	4,55	
15	0,31	4,5	
17	0,35	4,4	
24	0,44	0,35	Predominio de *Lactobacillus*. También se desarrollan levaduras y mohos. No se desarrollan Gram-negativos.
43	0,60	4,2	
57	0,74	4,1	
70	0,76	4,05	
101	0,93	4	
131	0,97	3,95	Pocos *Lactobacillus*. Muchas levaduras.
7 meses.	1,01	3,9	

De todas las siembras realizadas se han aislado una serie de cepas (más de 100), cuyo estudio y clasificación ha constituído una de las principales actividades del Laboratorio de Microbiología del Instituto. Aunque más adelante nos ocupemos con detenimiento de este asunto, queremos destacar ahora dos hechos que juzgamos de interés, por cuanto marcan diferencias con el proceso estudiado en California.

1.º No hemos aislado nunca, hasta ahora, ninguna cepa de Leuconostoc o similares.

2.º Tampoco hemos aislado ninguna cepa de Lactobacillus heterofermentativo.

El examen de los cuadros anteriores nos permite, igualmente, deducir algunas consecuencias interesantes. Primeramente, podemos establecer bien claramente tres estadios en el proceso de la fermentación, aunque de duración y valor algo diferentes a los señalados por Vaughn, Douglas y Gililland (16).

Estadio primario.—Aunque en los cuadros no se registran los datos has-

ta el segundo día, las salmueras tienen un pH inicial casi de 8 (7,72-7,55-7,32-7,10-6,65); éste desciende rápidamente, siendo ya a las veinticuatro horas de 5,70-5,35, cifras que se mantienen a las cuarenta y ocho horas y que siguen descendiendo. Este estadio lo hemos encontrado muy corto, de unos dos días en las salmueras 53-M, 57-M y 76-G, y tan sólo en la 144-G se ha extendido a tres días. Se caracteriza porque durante él sólo se desarrollan bacilos Gram-negativos del grupo *coli-aerógenes*, así como numerosos mohos y diversos bacilos esporógenos que forman colonias rugosas y ramificadas muy características. No se han aislado *Lactobacillus*; tampoco organismos del tipo *Leuconostoc* ni Streptococcus, encontrados por Vaughn, Douglas y Gililland. La formación de ácidos y descenso del pH, que, no obstante, se observan en estos primeros días, y que hace posible el ulterior desarrollo de las bacterias lácticas, se debe al tratamiento con lejía, que da lugar a salida de ácidos orgánicos de la aceituna y a diversos procesos de hidrólisis de azúcares, según queda demostrado en una comunicación anterior de J. M. R. de la Borbolla, C. Gómez-Herrera, R. Guzmán y R. Vázquez (7).

Este primer período es, quizás, el más importante del proceso fermentativo, pues de su buena marcha depende el que todo se conduzca bien en los períodos siguientes, o, por el contrario, que se originen alteraciones que deprecian el producto. Así, pues, pueden ocurrir tres casos en la marcha ulterior:

a) Todo marcha normalmente. Las especies formadoras de ácidos se desarrollan en tal número que la acidez producida hace imposible el desarrollo de los otros tipos. Los materiales fermentables están en forma perfectamente utilizable, lo que favorece el desarrollo de las bacterias lácticas, las cuales hacen descender el pH y aumentar la acidez.

b) Por causas diversas, las bacterias lácticas no se desarrollan convenientemente, siendo superadas por los microorganismos que deterioran el producto, tales como los Gram-negativos del grupo *coli-aerógenos* (principalmente *Aerobacter*), anaerobios butíricos (*Clostridium butyricum* y otros), aerobios facultativos, bacterias esporógenas del género *Aerobacillus* o levaduras.

c) La fermentación no se completa; son las llamadas «fermentaciones detenidas», que sólo se dan en las aceitunas de la variedad Manzanilla, y que consisten en que la fase primaria se estaciona, pesistiendo durante seis o más meses. Se debe esto, al parecer, sobre todo, al exce-

sivo desarrollo de levaduras que excluyen o inactivan a las bacterias lácticas, consumiendo los azúcares fermentables y destruyendo la pequeña cantidad de ácido láctico que haya podido producirse.

Estadio intermediario.—Su duración la hemos encontrado muy análoga a la dada por los autores norteamericanos: unos veinte días. Durante este período empiezan a desarrollarse los Lactobacillus, al principio escasamente y coexistiendo con los Aerobacter; paulatinamente van dominando en la población microbiana, al tiempo que los Gram-negativos van disminuyendo hasta desaparecer por completo. El pH continúa descendiendo, llegando a alrededor de cuatro al final, y la acidez total sube de 0,04-0,07 gramos por 100, a los tres días, hasta 0,36-0,70 grs. por 100 a los veinticuatro días; este aumento es también mayor y más rápido que el señalado por Vaughn y colaboradores, quienes registran 0,333 grs. por 100 a los veintiún días. También es característico de este estadio el desarrollo de levaduras, de las cuales hemos encontrado por lo menos tres o cuatro tipos de colonias, si bien no hemos realizado un estudio detenido de ellas. Las levaduras pueden, en ocasiones, ser causa de alteraciones de la salmuera y constituir, como es sabido, velos sobre ellas. Como ya anteriormente hemos indicado, no hemos aislado Lactobacillus heterofermentativos ni aun al final de este estadio.

Estadio final.—Coincidiendo bastante con las observaciones norteamericanas, a los veinticuatro días el pH ha descendido a 4,3-4,7, aumentando la acidez a 0,36-0,70 grs. por 100 (cifras más altas que en las de California). Sólo se desarrollan los Lactobacillus, faltando absolutamente las bacterias Gram-negativas y siendo escasas las levaduras. En cambio, en las siembras de salmueras de veinticinco-treinta días o más, se nos han desarrollado en medio de Levine unas colonias circulares y muy planas de una levadura constituída por células muy pequeñas (Pichia, Debaryomyces?).

Aproximadamente, a los siete meses y medio se ha hecho en las cuatro salmueras una última determinación de acidez y pH. Sus valores varían de unas a otras, pero los valores de pH son más bajos y los de acidez más altos que en California.

De acuerdo con las investigaciones anteriores de J. R. Borbolla, C. Gómez-Herrera, F. Pérez Núñez y R. de Castro (3), puede observarse también que en las salmueras de gordales (76-G y 140-G) la concentración

de ácido sube muy rápidamente durante los primeros días. Al no existir diferencias cualitativas en la población microbiana de las mismas con respecto a las manzanillas, es natural que ello se deba a diferencias meramente cuantitativas o en el material fermentable de que dispongan los Lactobacillus.

2) **Microrganismos aislados.**

Han sido los bacilos Gram-negativos durante los primeros días de la fermentación y los Lactobacillus y levaduras posteriormente. También se han aislado algunos bacilos esporulados (género Bacillus), que serán objeto de un estudio posterior, ya en marcha. Los bacilos Gram-negativos fueron clasificados como pertenecientes al género Aerobacter, Beijerinck, siguiendo el Manual de Bergey (1).

A continuación ofrecemos un cuadro-resumen de las características estudiadas. En él, F. A. significa «Fermentada con producción de ácido»; F. A. y G., «Fermentada con producción de ácido y gas».

Como resultado del examen de dicho cuadro, podemos afirmar que el bacilo Gram-negativo más abundante es Aerobacter cloacae (Jordán) Bergey et al, al que pertenecen 26 de las 30 cepas aisladas. Sólo cuatro cepas pueden clasificarse como Aerobacter aerógenes (Kruse) Beijerinck (Fig. 6).

Lactobacillus Beijerinck.— Son los microorganismos más importantes y más característicos de la fermentación de las aceitunas verdes y, por tanto, los más abundantes y los únicos que deben encontrarse en una fermentación avanzada, si ha marchado normalmente.

Hemos aislado y caracterizado 29 cepas, que han sido clasificadas como pertenecientes a la especie Lactobacillus plantarum (Orla - Jensen) - Holland (= Streptobacterium plantarum Orla-Jensen) (Fig. 7).

En el agar-agar, preparado con infusión de levadura y glucosa al 2 por 100, los lactobacilos se desarrollan, formando infinidad de colonias blancas, brillantes, circulares, de muy pequeño tamaño (Fig. 2). Hemos encontrado, a este respecto, dos tipos de colonias: unas puntiformes, que constituyen verdaderas nubes en las placas, y otras, algo menos numerosas y un poco mayores, como botoncitos brillantes, de un milímetro aproximado de diámetro. No hemos encontrado ninguna otra clase de diferencias entre las cepas que forman estos tipos de colonias.

CUADRO V

CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS DE GRAM-NEGATIVOS ESTUDIADAS

Cepas	Glucosa	Lactosa	Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Utilización de citratos	Gelatina	Glicerina	Clasificación
1	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	A. cloacae
2	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	No licuada	F. A. y G.	A. aerógenes
3	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	A. cloacae
4	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	No licuada	F. A. y G.	A. aerógenes
5	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	A. cloacae
6	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
7	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
8	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
9	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
10	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
11	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
12	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
13	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
14	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
15	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
16	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
17	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
18	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
19	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
20	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
21	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
22	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
23	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	No licuada	F. A. y G.	A. aerógenes
24	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	A. cloacae
25	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
26	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
27	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"
28	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	No licuada	F. A. y G.	A. aerógenes
29	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	A. cloacae
30	F. A. y G.	F. A. y G.	+	—	+	Licuada	F. A.	"

Particularmente interesante es la producción de acidez a expensas de azúcares, por las distintas cepas de Lactobacillus. Esta producción varía según la temperatura y ello permite establecer la temperatura óptima de desarrollo; además, son interesantes estas pruebas con objeto de seleccionar las cepas mejores (productoras de más acidez) y obtener cultivos puros de ellas, para inocularlos en los bocoyes de aceitunas, acelerando así la fermentación y corrigiendo las que se presenten defectuosas (véase el trabajo de Vaughn (16), así como los de Borbolla y colaboradores (6) (*). Para tales pruebas hemos utilizado la infusión de levadura con el 2 por 100 de glucosa; tubos conteniendo 10 c. c. de dicho medio de cultivo eran inoculados con las distintas cepas e incubados, durante una semana, a la temperatura conveniente. La acidez producida se determinó por titulación con NaOH 0,1 N. A continuación ofrecemos un cuadro con las acideces determinadas, lo que también puede verse, expresivamente, en la gráfica adjunta (fig. 1.ª).

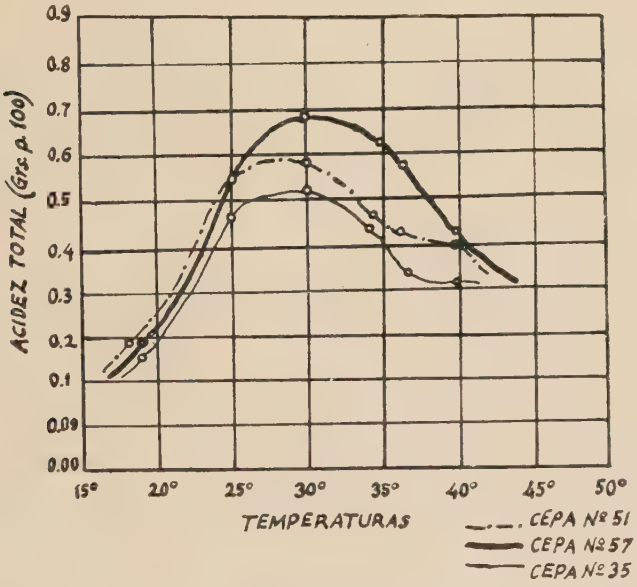


Fig. 1.—Gráfica de la acidez producida por algunas cepas de Lactobacillus *a diferentes temperaturas.*

(*) Por el Instituto de la Grasa se han realizado ya inoculaciones de bocoyes con cultivos puros de lactobacilos, cuyos resultados han sido altamente satisfactorios y pueden verse resumidos en una nota publicada en el núm. de abril-junio de 1952 de la revista *Grasas y Aceites.*

CUADRO VI

ACIDEZ PRODUCIDA A DISTINTAS TEMPERATURAS POR LAS CEPAS DE LACTOBACILLUS
(EXPRESADA EN GRS. POR 100 DE ÁCIDO LÁCTICO)

Cepas	19°	25°	30°	34°	37°	40°
31	0,228	0,592	0,406	0,486	0,360	0,360
32	0,218	0,434	0,568	0,486	0,360	0,355
33	0,208	0,576	0,675	0,675	0,352	0,324
34	0,193	0,522	0,655	0,603	0,396	0,391
35	0,177	0,477	0,518	0,450	0,352	0,315
36	0,183	0,513	0,594	0,486	0,386	0,279
37	0,142	0,441	0,594	0,510	0,305	0,045
38	0,157	0,495	0,589	0 540	0,365	0,324
39	0.197	0,455	0,575	0,530	0,340	0,255
40	0,224	0,434	0,520	0,486	0,335	0,245
41	0,157	0,522	0,639	0,558	0,352	0,315
42	0.198	0,515	0,675	0,558	0,348	0,298
43	0.198	0,567	0.628	0,459	0,416	0,398
44	0,203	0.513	0,635	0,603	0,386	0.378
45	0,203	0.513	0,589	0,432	0,416	0,398
46	0.198	0,432	0,568	0,452	0,356	0,316
47	0.219	0,434	0,518	0.432	0,398	0,324
48	0,177	0,515	0,536	0,489	0,396	0,298
49	0.199	0.523	0,635	0,558	0,335	0,278
50	0.225	0,522	0,536	0.459	0,334	0,255
51	0,173	0,558	0,594	0.459	0,451	0,405
52	0,239	0,549	0,594	0,450	0,432	0,429
53	0.132	0,468	0.549	0.441	0,330	0,297
54	0,228	0.486	0.599	0.432	0,429	0,396
55	0.177	0,558	0,614	0.441	0.386	0,297
56	0.228	0,549	0,670	0,477	0.459	0,376
57	0 198	0,549	0,691	0,621	0.558	0,436
58	0,218	0,540	0,628	0,628	0,401	0,315
59	0,218	0,513	0,610	0,610	0,414	0,376

El examen del cuadro VI nos demuestra que la temperatura óptima está comprendida entre los 30 y 34°, disminuyendo después a medida que la temperatura sigue aumentando, salvo algún caso anómalo, como el de la cepa núm. 31. En general, hemos obtenido valores algo más bajos que los obtenidos por Vaughn y colaboradores con las cepas aisladas en California, pero hay que tener en cuenta que dichos autores han aislado y estudiado, según su repetidamente citado trabajo (16), unas 150 cepas de Lactobacillus plantarum, encontrando algunas que llegan a producirles hasta 1,35 gramos por 100 de acidez a 34°, y otras que a la misma temperatura producen 1,16-0,9 gramos por 100. Nosotros, la mejor cepa que hemos aislado es la núm. 57, que ha dado cerca de 0,7 gamos por 100 a 30°, y por ello es una de las que ofrecemos su curva en la fig. 1.ª; también ofrecemos la de la cepa número 35, que podemos considerar como la peor, y la de la cepa número 51, que consideramos como de tipo medio.

Tenemos la esperanza de encontrar igualmente cepas que produzcan cantidades mayores de acidez, cuando, en años sucesivos, experimentemos sobre mayor cantidad de cepas de distintas procedencias.

Por último, queremos hacer hincapié en el hecho de que las diferencias que encontramos en el proceso con respecto a California (particularmente la ausencia de Leuconostoc y Lactobacillus heterofermentativos), no podemos considerarlas como definitivas, ya que no creemos imposible el poder aislarlas en años sucesivos de salmueras de otras procedencias, así como el que hayan podido o puedan encontrarlas otros investigadores con más fortuna que nosotros.

Agradecimiento.

Queremos hacer constar públicamente el nuestro para el Ingeniero argentino don Jorge S. Molina, por sus valiosas indicaciones técnicas.

Y dejamos para la última, aun siendo de fijo la primera en nuestra gratitud, a la señorita Ana María Navas Riao, cuya constante ayuda en todas las tareas de laboratorio nos ha sido valiosísima y sin cuyo concurso difícilmente hubiéramos podido llevar a término nuestros trabajos.

RESUMEN

Se hace un estudio microbiológico del proceso de la fermentación de las aceitunas verdes, comparando los resultados obtenidos con los anteriormente publicados por los investigadores norteamericanos en California. Como principal causante de la fermentación láctica se han aislado 29 cepas de la especie Lactobacillus plantarum, de las que se estudian algunas características, especialmente la acidez que producen a diferentes temperaturas, a expensas de azúcares (glucosa). También se han aislado, en las primeras fases de la fermentación, 30 cepas de bacilos Gram-negativos pertenecientes a las especies Aerobacter aerógenes (cuatro cepas) y Aerobacter cloacae (26 cepas). La fermentación en su conjunto puede dividirse en tres estadios: uno, primario, que dura unos tres días, en el que sólo existen bacterias Gram-negativas; otro, secundario, de unos veinte días, en el que, además de las Gram-negativas, se desarrollan los Lactobacillus y las levaduras, y, por fin, un último estadio, en el que sólo se desarrollan los Lactobacillus homofermentativos y algunas levaduras.

BIBLIOGRAFIA

(1) **R. S. BREED, E. G. D. MURRAY** y **A. P. HITCHENES.**—1948. Bergey's Manual of determinative Bacteriology. Sixth edition. Williams & Wilkins Company. Baltimore.

(2) **J. R. DE LA BORBOLLA Y ALCALA** y **C. GOMEZ HERRERA.**—1949. La industria del aderezo de aceitunas verdes. **Revista de Ciencia Aplicada,** 7, 120.

(3) ——— **C. GOMEZ HERRERA, F. PEREZ NUÑEZ** y **R. DE CASTRO RAMOS.**—1949. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. II. La fermentación. Publicación del Instituto Especial de la Grasa.

(4) ——— **C. GOMEZ HERRERA, R. GUTIERREZ G.-QUIJANO** y **R. VAZQUEZ LADRON.**—1951. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. IV. La concentración de la salmuera. **Revista de Ciencia Aplicada,** número 21.

(5) **J. R. DE LA BORBOLLA, C. GOMEZ HERRERA** y **R. GUTIERREZ G.-QUIJANO.** 1951. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. V. El pH de la salmuera. **Anales de la R. Soc. Esp. de Física y Química.** Serie B-Química. Julio-agosto.

(6) ——— **C. GOMEZ HERRERA, M. FERNANDEZ DIEZ, Señorita R. GUZMAN** y **Srta. R. VAZQUEZ.**—1951. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. VI. El control de la fermentación. **Grasas y Aceites,** 2-3. Julio-septiembre.

(7) ——— **C. GOMEZ HERRERA, Srta. R. GUZMAN** y **Srta. R. VAZQUEZ.**—1952. Estudios sobre el aderezo de aceitunas verdes. VII. Efectos del tratamiento con lejía. **Anales de la R. Soc. Esp. de Física y Química.** Serie B-Química. Mayo.

(8) **J. R. DE LA BORBOLLA Y ALCALA.**—1951. Problemas en el aderezo de aceitunas verdes. Publicación de la Asociación de Exportadores de Aceitunas Sevillanas. Sevilla.

(9) ——— y **C. GOMEZ HERRERA.**—1951. Preparación de aceitunas de mesa. **Ión,** 120. Julio.

(10) **M. MARTINEZ, M. ROMERO** y **L. MONZON.**—1951. Procesos químicos y microbiológicos en la fermentación de las aceitunas sevillanas. **Microbiología Española.** Vol. IV, núm. 2-3, págs. 103-108.

(11) **ANIBAL H. MERZARI** y **JORGE S. MOLINA.**—1949. Elaboración de aceitunas «tipo español» en la Argentina. **Ciencia e Investigación,** 5, 12. Diciembre. Buenos Aires.

(12) **J. S. MOLINA** y **A. H. MERZARI.**—1949. Influencia del aceite esencial de hinojo en el proceso fermentativo de las aceitunas verdes «tipo español». I. Acción inhibitoria sobre el desarrollo de las levaduras formadoras de velo superficial. **Revista Argentina de Agronomía.** Buenos Aires. 16. 4. Diciembre.

(13) **A. H. MERZARI** y **J. S. MOLINA.**—1950. Influencia del aceite esencial de hinojo en el proceso fermentativo de las aceitunas verdes «tipo español». II. Acción inhibitoria sobre el desarrollo de *Aerobacter aerógenes.* **Revista Argentina de Agronomía.** Buenos Aires. 17. 4. Diciembre.

(14) **J. S. Molina** y **A. H. MERZARI.**—1951. Influencia del aceite esencial de hinojo en el proceso fermentativo de aceitunas verdes «tipo español». III. Acción sobre los lactobacilos homofermentativos. **Revista Argentina de Agronomía,** 18. 4. Diciembre.

(15) **H. F. SMYTH.**—1927. A Bacteriology study of the Spanish green olives. **Journal of Bacteriology,** 13. 56.

(16) **R. H. VAUGHN, H. C. DOUGLAS** y **J. R. GILILLAND.**—1943. Production of Spanish-type green olives. **Bull.,** 678. Abril. University of California. Berkeley.

Salmuera de fermentación normal. (*Siembra en agar infusión de levadura glucosada.*)

Fig. 2.—Sin anetol. Se han desarrollado algunas colonias de levaduras, aunque menos que en la núm. 4, y también numerosas colonias de bacilos lácticos, que son las de tamaño más diminuto.

Fig. 3.—Con anetol. Esta substancia impide el desarrollo de levaduras, por lo cual sólo se desarrollan las pequeñas y numerosas colonias de lactobacilos. Se deduce que en la salmuera normal se desarrollan abundantemente los lactobacilos, dominando sobre las levaduras.

Salmuera de fermentación detenida. (*Siembra en agar-infusión de levadura glucosada.*)

Fig. 4.—Sin anetol. Se han desarrollado numerosas colonias de levaduras.

Fig. 5.—Con anetol. Como éste inhibe el desarrollo de las levaduras, no hay absolutamente nada en esta placa. Se deduce que en esta salmuera de fermentación detenida no hay desarrollo de lactobacilos y sí únicamente de levaduras.

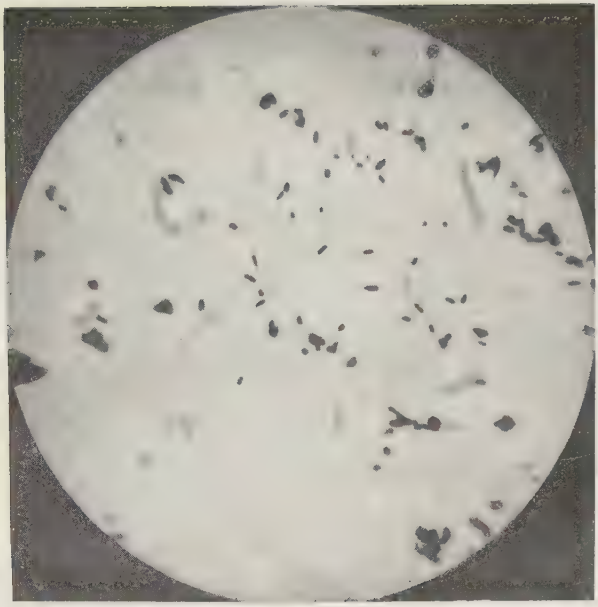


Fig. 6.—Aerobacter aerógenes. (*Cepa núm. 2, aislada de salmuera de tres días.*) *Aumentos 2.500 x.*

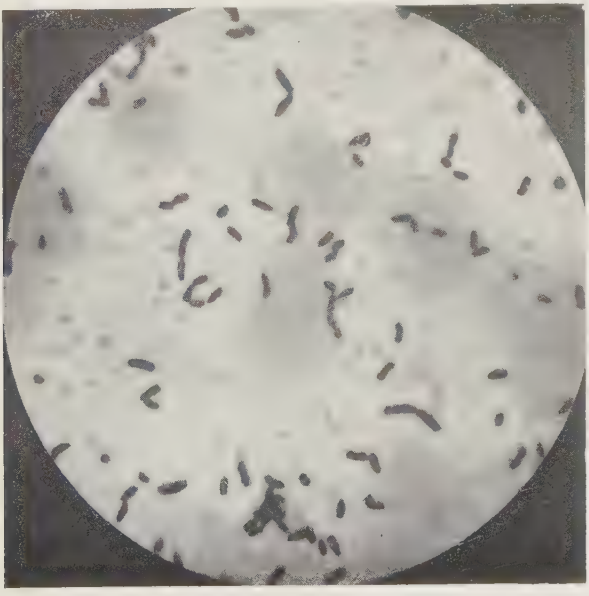


Fig. 7.—Lactobacillus plantarum. (*Cepa núm. 31.*) *Aislada de una salmuera en plena fermentación. Después de cultivada en infusión de alfalfa a 37° durante veinticuatro horas. Aumentos 2.500 x.*

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

TRANSFORMACION LEVADURA-BACTERIA Y ESTUDIO DE LOS BACILOS QUE RESULTAN DE LA TRANSFORMACION HONGO-BACTERIA

por
M.ª del Carmen Cándida González Vázquez.

SINTESIS DEL DESARROLLO DE LAS IDEAS PLEOMORFISTAS Y MONOMORFISTAS

En el último tercio del siglo XVII y comienzos del XVIII se desarrolla la vida del conocido investigador holandés Van Leéuwvenhoek, cuyas lentes son la revelación de un mundo nuevo, virgen todavía, que al explorarlo había de dar origen a la aparición de una nueva ciencia.

La curiosidad de este investigador le conduce a observar en diferentes substancias las llamadas actualmente bacterias y que él denominó «animálculos». En este nombre se incluyeron durante algún tiempo a todas las plantas, animales pequeños y bacterias, consideradas por entonces como seres pertenecientes al mundo animal.

Los primeros intentos de clasificación de los «infusoria» fueron realizados por el danés Otto Frederik Müller (1) —1733-34— que describe el género Monas y Vibrio; Ehrenberg (2) —1795-1876— amplía la clasificación, y Dujardin (3) —1841— las simplifica colocando a las bacterias en la familia vibrioniens con tres géneros: bacterium, vibrio y spirillum. Necesitamos llegar a Ferdinand Cohn (4), profesor de Botánica de Breslau, para ver aislados a estos organismos del mundo animal, y con ello establecer la Bacteriología como Ciencia. En 1854 sugiere, en una Memoria publicada «Sobre el desarrollo de algas y hongos microscópicos», que la familia vibrionia de Ehrenberg debe estar en el reino vegetal mejor que en el animal por las analogías que presenta con algu-

nas algas microscópicas; proponiendo que se llame Mycophyceae o Wasserpilze por la falta de cloroplastos y su abundancia en las infusiones.

En un trabajo dado a conocer dos años después (5), el investigador se nos manifiesta como creador de la doctrina monomorfista en el siguiente párrafo que transcribimos: «En la familia de las bacterias creo poder apreciar un gran número de géneros y de especies; admito que es demasiado difícil distinguir las variaciones provocadas por una modificación en la nutrición o en otras condiciones de existencia, de otros caracteres constantes, innatos, que se transmiten hereditariamente, los cuales sólo pueden servir de base para la caracterización de especies... El fundamento de la clasificación de las bacterias en géneros y especies la niegan aquellos que las consideran como un solo organismo, tomando en el curso del desarrollo, pero sobre todo bajo la influencia de las condiciones de existencia, formas muy variadas.»

Basándose en esta idea clasifica a las bacterias en cuatro grupos, y cada uno contiene uno o más géneros:

Tribu 1.ª: Sphaerobacteria.
Género Micrococcus.
Tribu 2.ª: Microbacteria.
Género Bacterium.
Tribu 3.ª: Desmobacteria.
Género Bacillus.
» Vibrio.
Tribu 4.ª: Spirobacteria.
Género Spirillum-Ehrenberg.
» Spirocaeta.

En esta época los organismos conocidos durante algún tiempo con el nombre de Clathocystis róseo-persicina, Monas Okenii, etc., son estudiados por Cohn, Ray-Lankester y Zoph. Cohn se ocupa principalmente de su fisiología, pero antes sostiene que su morfología está de acuerdo con la idea de uniformidad defendida y expuesta en sus trabajos.

En 1873, Ray-Lankester (6) encuentra en un cieno en maceración un grupo de formas rojas y granulaciones oscuras con estados intermedios

que parecen tener, según él, una relación genética indudable, reuniéndolos a todos con el nombre específico de Bacterium rubenscens.

En 1876, Warming (7) encuentra los mismos organismos en las costas de Dinamarca y a todos ellos los denomina Bacterium sulfuratum. Duda de las especies establecidas por Cohn y concluye diciendo: «Las bacterias están dotadas, en realidad, de una plasticidad ilimitada, y creo será preciso revisar el sistema de Cohn y el de otros investigadores que caracterizan los géneros y especies por su forma.»

Entretanto, en Francia se plantea el mismo problema respecto a las levaduras, y se preguntan si deben considerarse como especies autónomas o si representan, sencillamente, un estado más avanzado en el desarrollo de los hongos filamentosos que pudieran existir durante el otoño como levaduras y en el invierno como hongo micelial. Observan en determinados hongos estructuras semejantes a levaduras durante alguna etapa de su ciclo vital; y como algunas levaduras industriales, la de la cerveza por ejemplo, se cultivan desde tiempo inmemorial y otras se utilizaban ya en Egipto, siendo contemporáneas a los albores de su historia, deducen que por continuados cultivos podían haber sido domesticadas por el hombre, quedando reducidas a la forma constante de levaduras e incapacitadas para adquirir la forma de micelio.

Esta es la cuestión palpitante en el tiempo en que Pasteur investiga —1875—, y es entonces cuando comienza una serie de trabajos en los que observa que las levaduras encontradas en el pellejo de las uvas están presentes en ellas en una determinada época del año, coincidiendo con la madurez del fruto; pero al llegar el invierno desaparecen gradualmente de las uvas (8).

El problema sigue en pie: ¿De dónde llegan las levaduras y en qué forma pasan el invierno? Pasteur ve que un hongo, Dematium pullulans, en cuyo ciclo vital presenta estructuras levaduriformes, se encuentra muy abundante durante el otoño en el pellejo de las uvas; al mismo tiempo, Brefeld afirma en sus trabajos que las levaduras son formas del desarrollo de hongos complejos como Ustilagines. Pasteur, corroborando las afirmaciones de este último investigador, supone que las levaduras que se encuentran en las uvas proceden de Dematium pullulans y se expresa del siguiente modo: «Las células de las levaduras se originan de pequeños quistes de Dematium que el microscopio muestra tan abundantes en el polen de los frutos.»

A pesar de esta afirmación, más tarde había de renunciar a la idea, especialmente cuando Chamberland demuestra que estas levaduras de Dematium no son capaces de producir la fermentación alcohólica, admitiendo luego en trabajos posteriores la existencia de fermentos específicos para cada fermentación bien caracterizada.

Nägeli (9) emplea por primera vez el término schizomiceto y representa en esta época la tendencia opuesta a Cohn. Sus ideas pleomorfistas exageradas le inducen a considerar accidental en las bacterias la morfología y la fisiología; por tanto, su clasificación o sistematización es inútil. Las bacterias —dice— son células móviles o inmóviles, y «estas células pueden provocar, según las condiciones de existencia, todas las fermentaciones o todas las enfermedades infecciosas» (10).

Durante el año 1883 la teoría de Zoph (11) reemplaza a la de Nägeli. Admite la posibilidad de fundar especies basándose en los caracteres morfológicos; pero la teoría de Cohn debe ser sustituída por la de «la relación genética de las formas bacterianas o desarrollo complicado de las especies bacterianas». Según él, los géneros son estados de las formas vegetativas de las especies multiformes, y la transformación de una especie en otra depende principalmente de las condiciones de nutrición, como Nägeli había sostenido. Clasifica las bacterias en cuatro grupos:

Cocáceas — especie Leuconostoc mesenteroides.

Bacteriáceas — con dos grupos: { Bacterium. / Clostridium.

Leptotriáceas.

Cladotriáceas.

Los géneros Vibrio y Spirillum de las Spirobacterias de Cohn se suprimen y los considera como estados intermedios en el desarrollo de las Leptotriáceas y Cladotriáceas. La clasificación no podía ser definitiva, y tres años después se modifica, permaneciendo inalterables los grupos Leptotriáceas y Cladotriáceas e incluyendo en ellos especies como Begiatoa alba, B. persicina, tan pleomórficas ambas que serían capaces de adoptar las características de las descritas por Cohn.

Winogradsky, en 1887 y 1888 (12, 13); en un estudio sobre las bacterias del azufre, combate a los pleomorfistas, mientras Metchnikoff (14) —1888— es acérrimo partidario de esta doctrina.

Jörgensen —1895— (15, 16) está al corriente del excitante problema

planteado en Francia sobre las levaduras y sostiene, como había dicho Pasteur, su origen de las estructuras levaduriformes de Dematium que se encuentran presentes en la atmósfera y en el pellejo de las uvas. Admite también una relación entre los conidios de los hongos y las levaduras; opinión que defiende Sorel en el mismo año (17).

Durante los veinticinco-treinta años siguientes se atenúan las polémicas y las opiniones se inclinan a favor de las ideas monomorfistas sostenidas ahora por Koch y su escuela. Las bacterias son seres extremadamente específicos, con morfología propia, que varía muy poco según el medio de cultivo; se multiplican por bipartición sencilla y no se piensa en ningún otro proceso de reproducción.

Las investigaciones de Klöcker y Schiöming en 1896 (18), y las de Seiter en 1910 (19), niegan la transformación de levaduras en mohos o de éstos en levaduras, que intentaron reproducir —según ellos— en las mismas condiciones que podían darse en la Naturaleza.

Sin embargo, en 1905-6, Viala y Pacottet (20, 21) revisan nuevamente el problema, desarrollando sus experimentos con Gleosporium ampelophagum y Gleosporium nervisequum, consiguiendo transformarlos —cuando crecen en un medio favorable— en levaduras capaces de llegar hasta la fermentación alcohólica y de formar endosporos idénticos a los que se originan en los Saccaromycetos. Las levaduras así obtenidas, dicen ellos, conviene fijarlas por cultivos sucesivos en el mismo medio y lograr, de este modo, la imposibilidad de que vuelvan al estado de micelio. Si el paso de levaduras industriales a micelio no se consigue, se debe, aseguran, a su larga existencia en el estado de levaduras que ha hecho imposible el cambio.

En 1907-8, Guillermond (22, 23) intenta reproducir los experimentos de Viala y Pacottet, y al no conseguirlo cree que impurezas en los cultivos pudieron explicar los resultados de los investigadores. En otros trabajos expone que las levaduras consideradas por dichos autores como derivadas de las estructuras levaduriformes de Gleosporium nervisequum tienen idénticas características que las estructuras semejantes a levaduras de una especie de Dematium muy abundante en todas las hojas y corteza de los árboles, desarrollándose casi siempre en estado de impureza en los primeros cultivos artificiales de Gleosporium nervisequum. A estos datos atribuye el autor las conclusiones de Viala y Pacottet.

A partir de 1914 resurgen de nuevo las ideas pleomorfistas cuando varios autores llaman la atención sobre nuevos modos de reproducirse las bacterias, muy diferentes a los sencillos procesos de división binaria.

En los trabajos de Löhnis con el azotobacter en los años 1914-16 y 21 (24, 25, 26), en los de Hort en el 17, Enderlein en el 25 y Mellon en el 26, se describen estas variadas formas de reproducción, que para algunos bacteriólogos no pasan de ser defectos de las técnicas de tinción o simples impurezas. Las experiencias de Löhnis y Smith fueron, en 1920, confirmadas parcialmente en los trabajos publicados por Jones (27).

En el mismo año, Bewley y Hutchinson (28) demuestran que el Rhizobium leguminosarum, según el medio de cultivo, se presenta en forma de cocos pequeños inmóviles, cocos mayores, células elipsoides ovaladas móviles capaces de atravesar los filtros Chamberland, fase bacilar móvil y más grande y, finalmente, la vacuolar, en la que la cromatina se divide en franjas transversales, que se vuelven redondeadas, abandonando el bacilo y reproduciendo la fase primera de cocos.

Lewis, en 1938 (29), opina que no hay razón para suponer una forma especializada de reproducción en dicho organismo, considerando la sucesiva serie de cambios morfológicos como un fenómeno común en otros grupos de bacterias; y en cuanto a la vacuolación, se debe —según él— a la presencia de glóbulos de grasa.

Durante el año 1923, Löhnis y Smith (30) dan a conocer un trabajo ilustrado con siete láminas y describen el proceso de reproducción del azotobacter por «gonidias» o gránulos que se forman en el protoplasma de las bacterias, y en un determinado grado de madurez pueden, cada uno de ellos, adoptar la forma genuina y típica de la bacteria.

Thomton y Gangulee, en 1926, exponen un proceso semejante al de Bewley y Hutchinson en el B. radicola (31).

Fontés, después de su original trabajo con el bacilo de Koch en 1910 (32), estudia la filtrabilidad de este bacilo y asegura que tales formas filtrables pueden multiplicarse in vitro y en el cuerpo del animal. Otros autores, como Vaudremer (34), Hauduroy y Vaudremer, en el mismo año (35), y Valtis, en el 24 (36), están de acuerdo con dicho investigador. Calmette, en el 28 (37), revisa estos trabajos y su opinión es análoga a la de los autores citados, aunque no aporta, con su esfuerzo, nuevas conclusiones sobre este asunto.

Fontés repite estos trabajos con otras bacterias y describe la repro-

ducción por «cromidios» (36). Según él, los cromidios serían partes integrantes de un núcleo disperso que al quedar libres por la destrucción del protoplasma bacteriano podrían individualmente engendrar la bacteria típica.

Sweany, en 1928 (39), y Kahn, en 1930 (40), afirman también que el bacilo de la tuberculosis puede desintegrarse en gránulos capaces de reproducir el bacilo normal, y Mellon (41) admite un verdadero ciclo evolutivo del mismo bacilo en formas intermedias no ácido-alcohol-resistentes de tipo difteroide y granuloso.

Las publicaciones de Löhnis han despertado interés e inducen a toda una pléyade de investigadores a estudiar el pleomorfismo de las bacterias, apareciendo trabajos como los de Niemeyer en 1924 (42), Petchenco en 1930 (43), Wilcke en el mismo año (44), Krassilnikov en el 31 (45), De Regel al año siguiente (46) y Bachinskaya en el 35 (47), sobre la morfología del azotobacter en condiciones de cultivo controladas.

Dunlop y Maitland, en el 32, observan un pronunciado pleomorfismo en una especie de Proteus vulgaris aislado de un tipo de cistitis, al aumentar o disminuir el contenido de cloruro sódico. La morfología de este bacilo se conserva constante en repetidos subcultivos en cualquier medio. A pesar de ello, no hablan de ciclo vital (48).

Linton en 1935 (49), Taylor y Ahupa en el 35-36 (50), Linton, Seal y Mitra en el 38 (51), aseguran haber conseguido en el laboratorio la transformación del vibrión colérico en otro tipo de vibrión cuando se cultiva en condiciones desfavorables.

Stuard-Harris (52) y colaboradores describen un Streptobacilo pleomórfico aislado de un proceso de endocarditis. Si se cultiva en un medio a base de sangre y caldo digerido, adopta la forma de cocos Gram-positivos que crecen en cadenas largas; al resembrarlo en medio sólido da streptobacilos, bacilos y formas streptocócicas en cadenas no muy largas; cuarenta y ocho horas después, en este mismo medio, casi todas las formas son bacilos o leptobacilos. En caldo-suero el organismo aparece en cortas cadenas de bacilos rechonchos que adoptan las formas streptocócicas al cultivarlos en agar-caldo de corazón. Gram-positivo cuando joven y Gram-negativo al envejecer. Este germen se comparó e identificó como Streptotrix muris ratis, que a su vez es parecido o idéntico a los organismos relacionados con la pleuroneumonía, cuyo miembro más interesante, llamado por Klieneberger L, (53), lo obtiene cultivando el

Streptobacillus moniliformis en un medio preparado con ascitis-agar flúido. El organismo L_1 aparece en todos los cultivos de los gérmenes Gram-negativos de la pleuroneumonía y no se sabe si está íntimamente relacionado con ellos o si se trata de un mismo germen que sigue conservando la capacidad de crecer en formas filamentosas, mientras que aquéllos las perdieron. Cultivos de organismos L_1 presentan siempre células típicas del Streptomoniliformis; por esta razón hay autores, como Dienes (54) y Dawson y Hobby (55), que defienden la existencia de un ciclo evolutivo, y con Heilman (56) consideran a estos organismos como una variante del mismo bacilo. Según Brown y Nunemaker (57), el streptobacilo citado no es más que una forma variante del L_1. Warren (58), después de un cuidadoso estudio metabólico de las dos formas, opina que se trata de un mismo organismo.

«En vista del descubrimiento de los gérmenes pleuroneumónicos y pleuroneumoides en cultivos puros de gonococos y de varias otras bacterias —dice Frobisher (59)—, hay la posibilidad de que existan como una variante de todas las bacterias; en tal caso habría que hacer una revisión de nuestras nociones sobre los ciclos vitales, modo de multiplicacón, metabolismo y otros muchos factores concernientes a los Schizomycetos.»

De todos modos, el monomorfismo de Cohn y Koch tiene actualmente un magnífico paladín en la persona del Prof. Winogradsky (60), que en sus trabajos se muestra enemigo irreconciliable de las ideas pleomorfistas, defensor acérrimo de la escuela alemana, pretendiendo a fuego y sangre explicar los complejos ciclos de algunas bacterias estudiadas por él mismo, manteniendo en pie la idea de especificidad y uniformidad heredada de Cohn y su escuela.

No pretendemos en un breve e incompleto resumen como el que precede hacer el estudio exhaustivo de dos grandes tendencias que quieren explicar el modo de ser de los Schizomycetos y de los Eumycetos.

Sólo situarnos, en una visión esquemática, pero de conjunto, en nuestro momento actual a través de la historia de la Microbiología.

Sin pretender que se nos considere como eclécticos, lo cierto es que casi siempre las teorías tienen un algo de verdad que no es toda la verdad, y un algo de error que no significa que todo sea erróneo. Es muy posible que para la Bacteriología fuera un bien que en su época clásica —último tercio del siglo XIX— ante el pleomorfismo venciera la tenden-

cia monomorfista, ya que esta última doctrina era el modo más fácil que tenían los primeros investigadores para poner orden en aquel tan bien llamado «chaos infusoria» de Limneo. Mas esto no quiere decir que ellos tengan toda la razón y que hubiera derecho a negársela a los pleomorfistas. Nuestro concepto es que estaban en un m o d u s o p e r a n d i práctico. Así, pues, a través de los años subsiguientes y a medida que los postulados de Koch fueron tomando fuerza a la par que la Bacteriología caía en el exclusivismo de una ciencia médica, no es de extrañar que quedase enseñoreando el terreno de esta ciencia el concepto monoformista, sostenido ahora por Koch y su escuela. Pero allá hacia el año 20, cuando ya los estudios permitían establecer un orden, los investigadores de mentes poco conformistas y conservadoras iban dándose cuenta de que muchos problemas bacteriológicos concluían en callejones sin salida, y que sólo conceptos radicalmente opuestos a los que se habían convertido por ley de la costumbre en ortodoxos eran capaces de resolver tales problemas, y es así cómo de nuevo van surgiendo lenta y timoratamente las ideas pleomorfistas. En consecuencia, consideramos que el concepto o doctrina pleomorfista debe admitirse de nuevo, pero siempre con gran circunspección y prudencia.

Por otra parte, la Química Biológica actual ha dado un avance enorme en comparación con la de fin del siglo pasado; por esta razón comprendemos que los medios de cultivo hasta ahora usados se caracterizan, especialmente, por una enorme carencia de capacidad para el dinamismo metabólico. En los estudios del pleomorfismo, el mayor de los inconvenientes que ha de salvar el bacteriólogo es la esterilización que imprime una pobreza extrema a los medios en cuanto al dinamismo antes citado. De aquí la importancia enorme de dichos medios de cultivo y en especial de la Química Microbiana.

La exposición que va a seguir de nuestro trabajo se apoya en estas ideas, aunque, claro está, con modestia hemos de considerar que si el esfuerzo es grande para nosotros, su resultado sólo podemos calificarlo de balbuceo.

Para aquellas mentes que por razón de la costumbre se sientan radicalmente monomorfistas, les pedimos tan sólo comprensión y paciencia; el trabajo y el tiempo —factor importantísimo en el laboratorio— harán todo lo demás.

DESARROLLO DE LA IDEA DE TRANSFORMACION MOHO-BACTERIA: ANTECEDENTES

Después de nuestra escueta reseña sobre las ideas pleomorfistas y monomorfistas, establecido ya nuestro concepto, damos comienzo a este capítulo iniciándolo con el nombre de un ilustre investigador —el más somero análisis de su obra supondría varios trabajos científicos— en el que él tiene, sin duda, una aportación innegable. Esta figura, digamos ya, es Jaime Ferrán, nuestro más grande bacteriólogo, cuyas ideas y sus obras lo destacan como pleomorfista, aunque él, es muy posible, no haya tenido conciencia de su situación como tal.

Ferrán, en sus descubrimientos de la vacuna colérica, se basa en la modificación que el vibrión sufre, especialmente por el envejecimiento; pero donde se demuestra plenamente su ideología es en el ciclo vital que describe en el bacilo tuberculoso, en sus formas alfa, beta, gamma y epsilon. Jaime Ferrán, por aquella limitación, a la que antes hemos aludido, de la Química microbiana, no pudo ir más allá, a pesar de su esfuerzo titánico. Esta es la causa de que, habiendo observado muchos procesos de un ciclo vital, mejor dicho, intuyendo más de una vez, no pueda luego reproducirlos experimentalmente, y le falta, por consiguiente, esa base experimental indispensable para dejar terminado un trabajo de investigación. Pero Ferrán fué quien por primera vez describe y da a conocer la transformación del bacilo de Koch en formas no ácido-alcohol-resistentes en los trabajos publicados durante los años 1879 a 1923 (61).

En 1944, el Profesor Socías (62) publica en la «Revista de Sanidad» un trabajo que lleva por título «Formas pseudocelulares del agente etiológico del tracoma». En él llama la atención sobre unas células que se encuentran en los cortes del contenido patológico de las granulaciones de conjuntivas tracomatosas, consideradas hasta entonces por los anatomopatólogos como células pertenecientes al tejido humano. En las microfotografías que acompañan al trabajo se pueden ver estas células en los cortes y frotis de dichas granulaciones. Por una serie de datos y estudios epidemiológicos, que no vienen al caso exponer aquí, llega a la conclusión de que tales células pertenecen al agente productor de la endemia tracomatosa y son de origen micósico.

En 1946, la Memoria presentada como tesis doctoral en la Facultad de Ciencias Naturales (63) viene a ser una continuación del trabajo dado

a conocer en 1930 (64) sobre una variación o transformación de las colonias del Pseudomonas aeruginosa. En dicha Memoria describe el modo de lograr experimentalmente un nuevo tipo morfológico de colonia —colonia G o gelatinosa— y una nueva forma de reproducción del organismo que nos ocupa, desconocida hasta entonces, comparándola con el proceso seguido por el Streptobacillus moniliformis y el Asterococcus micoides, aunque tiene en su caso características propias. Describe el ciclo vital del organismo, y al final dice: «Creemos de interés extraordinario el poder establecer que una bacteria, cuyo desarrollo y reproducción hasta ahora seguían en las descripciones la manera clásica de la Bacteriología, tiene además otro proceso reproductivo, que no es el lento y limitado de la división binaria, sino uno que puede dar nacimiento a un gran número de unidades, como simiente al ser de tan pequeño tamaño, y, por tanto, su propagación, según este proceso, ha de ser más intensa.»

En este mismo año (65), en el trabajo presentado para las oposiciones a cátedra de Bacteriología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Madrid, que, aunque inédito, se halla depositado en el archivo del Ministerio de Educación Nacional con el título «Posible ciclo evolutivo de levadura bacteria de un Geotrichoides», refiriéndose a este posible ciclo, dice:

«En un cultivo en medio Czapek maltosado, que tenía más de un año de vida y había sido conservado a temperatura ambiente después de un mes de crecimiento a 37° y luego tapado, además del algodón, con tapón de goma fuertemente, a fin de evitar una desecación en lo posible, encontramos que el cultivo, que seguía húmedo y cremoso, estaba formado por células de varios tipos y dispuestas de tal manera que en un frotis se veían acúmulos en los que las células estaban dispuestas a modo de las piedras de un mosaico. Muchas de estas células tenían un contorno poligonal —casi siempre pentagonal— bastante regular. Con la tinción de Gram, la mayoría eran negativas en la parte que se dejaban teñir, ya que un gran número dejaban de hacerlo aún con la coloración de fondo y se presentaban, por consiguiente, hialinas y sólo tenían exclusivamente coloreados los bordes. Alguna que otra presentaba una coloración central, por lo regular Gram-positiva, de forma redonda u oval, y entre ella y la pared quedaba una forma de dos a tres micras, también hialina. Estas formas celulares eran las menos. Otras presentaban todo su espacio hia-

lino, excepción hecha de unos corpúsculos redondos, Gram-positivos, de dos a seis micras y dispuestos junto al mismo borde interno del espacio celular. Otras formas análogas a éstas, pero idénticas a la morfología de la levaduras, se encuentran distribuídas entre las descritas.»

«Lo que nos llamó la atención fué que entre las células descritas y, al parecer, adheridas a las paredes de estas células se encontraban unas formas de bacilos (Gram-positivos) de unos cinco a siete micras de largo y de media a una de ancho. Estos bacilos estaban aislados unos de otros. Los mismos se encuentran además, en el campo del microscopio, fuera de tales acúmulos celulares.»

«Si sembramos tal cultivo en medio Czapek maltosado y lo hacemos en abundancia, a las cuarenta y ocho horas, a 37°, salen unas pocas colonias del tipo de levaduras, cremosas, blancas y húmedas, que sólo contienen elementos levaduriformes normales. Si la resiembra se hace en medio líquido de Sauton, se desarrolla el cultivo abundante a las veinticuatro horas, enturbiando uniformemente el medio, y a los pocos días se forma un velo espeso en superficie. A medida que envejece, va tomando un color amarillo-verdoso, para llegar a ser verde oscuro. El cultivo está formado a base de un bacilo Gram-positivo, que morfológicamente corresponde al antes descrito; hay, además, escasas formas en levadura. Nos bastó una resiembra de este cultivo en otro matraz del mismo medio para que quedase el cultivo puro de las bacterias sin levadura.»

«Por la disposición de los elementos bacilares que encontramos entre las células descritas en el cultivo sobre Czapek envejecido, tuvimos la impresión de que se trataba de una mutación de la levadura, y no de una contaminación. Estableciendo esta idea como teoría, procuramos repetir la experiencia, y a este fin sembramos la levadura en distintos medios y comprobamos que aquellos ricos en proteínas, como caldos, en medio de Löwenstein, los medios con suero, etc., siempre y cuando fuesen sembrados de formas filamentósas, conservaban las características de dar colonias cremosas fácilmente emulsionables, y a través de las resiembras conservaban sus propiedades, no consiguiendo mutación alguna y presentándose con el envejecimiento tan sólo formas clamidosporales.»

«Si sembramos la levadura de tipo anterior en medios pobres, especialmente en jugo de patata, se forma a las cuarenta y ocho horas un velo delgado en superficie que está formado por filamentos pseudomicelios, y resembrando en medios pobres en proteínas y ricos en azúcares

—polisacáridos, almidón, destrina, etc.— conservan la característica de dar filamentación abundante, que, una vez estabilizada, también se presenta si se resiembra en medios ricos en proteínas.»

«En los medios de Czapek, modificado por Dox Thon, al que se le añade un azúcar, que en nuestro caso es la maltosa al 3 por 100, si sembramos la levadura procedente del jugo de patata, se produce la filamentación abundante; pero teniendo cuidado de cerrar el tubo con tapón de goma fuertemente después de haber llegado a un crecimiento máximo, o sea, a los quince días, las colonias siguen cremosas y las formas de levaduras abundantes. A medida que transcurre el tiempo, estas células en levadura se van transformando en las células poligonales, esféricas, etc., ya descritas, y creemos interpretar bien al decir que el pseudomicelio se va transformando paulatinamente en filamentos más delgados cada vez, como si sufriese una degeneración, hasta llegar a transformarse en la forma bacilar expuesta. Es conveniente que el medio sea húmedo y blando.»

Estos trabajos vienen a ser como el pórtico o la introducción a uno más interesante, definitivo, que a su vez abre un nuevo camino a la Ciencia, conduciéndola por sendas ignotas que sólo «apuntan» o «alborean». Esta comunicación fué hecha en 1949, y lleva por título «Un hongo (Eumyceto) se transforma en bacteria (Schizomyceto)» (66).

Los hongos que se utilizan en este trabajo de transformación fueron aislados de conjuntivas tracomatosas, tal como se explica en la comunicación hecha en el año 50 (67) por el mismo autor, expresándose del siguiente modo:

«Por circunstancias que en una próxima publicación estudiaremos, llegamos a la conclusión de que estos hongos podían presentar una fase, variación, transformación —o como se la quiera llamar—, en la que la forma Eumyceto se transforma en la correspondiente a las bacterias o Schizomycetos.»

«Durante años hemos intentado que tal idea se convirtiera en hecho experimental. A este fin probamos multitud de procedimientos, así como medios de cultivo preparados con múltiples substancias, todo ello como resultado de hipótesis de trabajo que una y otra vez, al no ajustarse a la verdad, eran causa de nuestros fracasos. Por fin, creemos haber conseguido experimentalmente tal transformación en el laboratorio, siéndo-

nos posible estudiarla y reproducirla mediante el método que a continuación exponemos.»

«Los citados Aspergillus son conservados desde el año 1944 en el laboratorio, mediante siembras cada tres meses en el medio de Czapek modificado por Dox, según la fórmula:

NO_3Na	0,3	grs.
PO_4HK_2	1,0	»
$SO_4Mg\ 7H_2O$...	0,5	»
Cl K	0,5	»
$SO_4Fe\ 7H_2O$	0,01	»
Agua	1.000	c. c.
Agar	c. s.	

Esta fórmula sólo se ha modificado sustituyendo la sacarosa por la maltosa.»

«Trabajamos a base de cultivos de estos Aspergillus, sembrados en este medio y crecidos a temperatura de 25°, en tubos y en estría, y en condiciones de plena madurez del aparato conidiano; con este fin, por lo regular, hemos tomado un lapso de tiempo de tres meses de crecimiento, aunque se presenta mucho antes.»

«Medio de cultivo:

a) Un kilo de toronjas en sazón son mondadas superficialmente, quedando un grueso albelo que recubre una pulpa escasa. Esta última es exprimida y el albelo triturado finamente.

b) Al triturado se le añade 500 c. c. de agua y se le hace hervir durante una hora. Se le añade agua hasta completar un litro y 10 c. c. de amoníaco concentrado. Se deja a temperatura ambiente durante doce horas.

c) Se filtra a través de un papel de filtro para jarabes. Al filtrado se le añade cloruro cálcico al 10 por 100, hasta que se forme un gel de pectato cálcico.

d) Este gel se filtra y se lava con agua abundante, a fin de eliminar todas las substancias solubles y que sólo quede el pectato cálcico con una relativa pureza. Este gel es luego desmenuzado en el mortero. Tiene un pH de 7. Se esteriliza suspendiéndolo en caldo común y en agar, en cantidad suficiente para la consistencia corriente de los medios sólidos. Se reparte en tubos e inclina.»

«Método de siembra:

Con el asa de platino se hace una toma de los conidios del cultivo antes dicho de los Aspergillus en Czapek maltosa y se siembran varios tubos, en abundancia. Se dejan en la estufa a 37°.»

«Desde las cuarenta y ocho horas, y hasta los cinco o seis días, aparece en los tubos sembrados, y en una proporción de un 30 por 100, un cultivo de aspecto bacteriano y no fungiforme. A la vez, y como control, se han hecho siembras en distintos medios de cultivo, como agar común, agar-peptona-glucosa, Czapek-maltosa-agar, que también son mantenidos a 37°.

En estos tubos de control nunca ha aparecido el cultivo bacteriano, y sí el correspondiente y de tipo normal del Aspergillus.»

«Repitiendo la siembra varias veces, hemos conseguido fácilmente la transformación de las cinco estirpes con las que trabajamos.»

En el mismo trabajo se describe otro procedimiento, por el que aparece el cultivo bacteriano «en un 60 por 100 de los tubos a las veinticuatro horas, o antes, y tiene la ventaja de que, debido a la rapidez de la transformación, si hacemos una extensión del cultivo sobre el portaobjetos y lo teñimos con el May-Grünwald, pueden observarse, al lado de las formas bacterianas, conidios de los sembrados que están repletos de formas bacterianas que luego crecen en el medio como corresponde a las bacterias.»

«De aquí, pues, que deduzcamos que la transformación se produzca en el interior, o sea en el protoplasma de los conidios.»

A continuación expone las razones por las que su teoría no puede considerarse como una contaminación, y luego dice: «Podría explicarse el fenómeno como una disociación de una simbiosis que sólo se produciría en el medio dicho. Esta simbiosis Aspergillus-bacteria tendría que ser de tal naturaleza que la bacteria se encontrase en el interior del protoplasma del micelio o de las conidias del hongo, lo que no es fácil de comprender.»

«Nosotros explicamos el fenómeno como una transformación normal del Aspergillus en bacteria, y no lo consideramos como una mutación rara. Sería un paso más en la degradación en el proceso de reproducción de los ascomicetos, que, como es sabido, pueden presentar forma perfecta o sexuada y una imperfecta —Fungi imperfecti— no sexuada que se reproduce mediante la germinación de las conidias-esporas.

Estas conidias, mediante un factor de crecimiento, en vez de desarrollarse por gemación, lo harían por una merotonía endógena, transformando su protoplasma en un cierto número de bacterias, las cuales serían capaces de desarrollarse por división binaria, como los Schizomycetos.»

Antes de continuar con nuestro resumen, queremos resaltar la clara visión que tuvo el Prof. Socías de la transformación moho-bacteria, a pesar de que, en aquel entonces, las técnicas empleadas carecían de la delicadeza y finura actuales, y de que las opiniones de investigadores contemporáneos, contrarias a admitir tal proceso, hablaban en favor de una contaminación y, cuando más, transigían por una simbiosis. Actualmente, el empleo del microscopio de fase nos ha permitido, en alguna ocasión, seguir el fenómeno y comprobar que las hifas y conidios del hongo, antes de crecer en el medio de transformación o antes de la resiembra en agar —de acuerdo con los procedimientos más modernos que luego expondremos—, no tienen en su interior nada que indique el más leve indicio de una bacteria. Por tanto, el considerar a este proceso como una simbiosis que se disocia —en nuestra opinión— nos parece desacertado. De ser así, habrá que estudiar y definir un nuevo tipo de convivencia, en la que uno de los simbiontes, antes de que se realice la hipotética disociación, debe tener un tamaño tan pequeño que no se distingue con el microscopio de fase —1500x—, y, una vez que aquélla se realiza es preciso admitir que se desarrolla hasta lograr hacerse visible. Por consiguiente, estamos otra vez ante un fenómeno biológico que, se llame como se llame, supone un cambio de un modo de ser a otro distinto, una fase de un ciclo evolutivo, una transformación duradera y estable o, si se prefiere, la especial génesis de un organismo que aún no ha sido descrita.

En la misma comunicación dice:

«En la transformación hay otra cuestión:

En vez de seguir los procedimientos que acabamos de indicar, llevamos a cabo la experiencia con el medio de cultivo a base de pectato cálcico, como el primer procedimiento, y en vez de añadir agar, sólo se mezcla con caldo común y se distribuye en matraces de Erlermeyer, de tal manera que, una vez reposada la suspensión del gel triturado, alcance una altura de unos 15 cm., y por encima de él haya una capa de caldo

común de unos tres cm. La mezcla puede tener un pH que vaya de siete a cinco. Se esteriliza a unos 120°.»

«Método de siembra:

Con las conidias de los cultivos maduros en Czapek-maltosa se hace una suspensión en solución alcalina. Se siembra un c. c. de esta suspensión con una pipeta Pasteur, de modo que la siembra se haga en profundidad. Estos detalles son de importancia, ya que se pretende que las conidias no sobrenaden sobre el medio —lo que suele ocurrir, debido a su alta tensión superficial—. Si las conidias se siembran en superficie la transformación no se realiza, y si aparece es del tipo antes citado en los procedimientos que preceden.»

«Se llevan los matraces a 37°. A los siete u ocho días, a veces más, se puede observar un enturbiamiento del medio, antes claro. Si hacemos una extensión y teñimos, veremos que hay un gran número de formas coccáceas (Micrococcus).»

«Resulta, por tanto, que en este caso la transformación —más difícil de controlar que en los casos anteriores— se ha realizado, pero dando otro tipo de bacteria. Esto hace suponer que en el momento de la transformación tiene gran importancia el medio ambiente.»

En trabajos publicados en años sucesivos se determina cuál es el factor de transformación moho-bacteria, y así, en 1951, A. Socías y G. Sierra (68) obtienen pectina —partiendo del albelo de la toronja— y de ésta pectato y pectinato sódico, que en soluciones al 1 por 100 sirve de base para elaborar los siguientes medios de cultivo:

1) Pectato sódico y agar común.
2) Pectato sódico, glucosa y agar común.
3) Pectinato sódico y agar común.
4) Pectinato sódico, glucosa y agar común.

Estos medios se reparten en tubos, se inclinan y en ellos se siembran los Aspergillus, que incuban a 27°.

Tres meses después, las conidias de los hongos, bien desarrolladas, se transfieren a agar común y «solamente dan la transformación las procedentes del medio cuarto y en un porcentaje de un 95 por 100».

Llegaron, pues, a la conclusión de que el agente causante de la transformación es el pectinato, a través de los grupos —CH_3 y con la influencia de la glucosa.

«Estos factores preparan al Aspergillus para la transformación, pero luego ésta se da sobre el agar común a 37º.»

En el mismo año, un nuevo trabajo explica la relación que puede existir entre le metilación orgánica como factor de transformación y el tracoma (69), demostrando en un cuidadoso estudio que «el pescado puede ser invadido por los Aspergillus dichos, y éstos pueden sufrir el proceso de metilación. Con esto aceptamos, además, el criterio de que en el caso de los pectinatos son los radicales metilos los que actúan como factor, o sea que el proceso de transformación se basaría en un medio de cultivo capaz de dar una metilación orgánica y —posiblemente de la glucosa— alterando el metabolismo del moho.»

«Así, pues, según esto, el proceso de metilación sería común —por uno u otro procedimiento— a todos los factores epidémicos que nosotros hemos estudiado en el tracoma y causaría la transformación del Aspergillus anstelodamy y peniciloides en bacterias y formas ricketsoides dentro de un ciclo vital.»

«La metilación, en general, es un proceso químico que se da en los organismos y por diversos procedimientos. Una de las fuentes principales de la metilación parece ser la colina, que es uno de los componentes clásicos del complejo vitamínico B, y es posible que sea una substancia especial, precisamente por ser fuente de los grupos —CH_3.»

«En consecuencia, hicimos la prueba de sustituir en nuestros medios de cultivo los pectinatos por la colina, y así preparamos el siguiente medio:

Sol. de sales de Czapek	100 c. c.
Colina	1/2 gr.
Glucosa...	2 »
Agar...	c. s.

«Sembramos los Aspergillus en este medio y en otro en el que sustituímos las sales de Czapek por caldo común, y los cultivamos a 27º; los dejamos crecer y madurar durante tres meses, al cabo de los cuales hicimos siembras de estos cultivos en agar común a 37º, obteniendo la transformación moho-bacteria en todos los casos.»

Situado así el problema de la transformación moho-bacteria y expuestos los datos que nos han servido de orientación y guía, vamos a ver cómo ellos nos han conducido a los resultados que a continuación describimos.

TRANSFORMACION LEVADURA-BACTERIA

Al comenzar nuestro trabajo, dos hechos tuvimos presentes: la transformación de cinco Aspergillus en bacterias (66) y la de dos levaduras, de una manera espontánea, en el mismo tipo de bacilo.

Ellos han sido la base y cimientos de todo lo que a continuación exponemos. Más tarde, logrado nuestro propósito, hemos tenido ocasión de cnocer otros trabajos contemporáneos al nuestro, en los que se perseguía la misma finalidad. Oportunamente hablaremos de ellos.

El material empleado son las levaduras siguientes:

Núm. 2.....	Torulopsis molischiana (Zikes).
Núm. 6.....	Torulopsis holmii (Jorgensen).
Núm. 9.....	Cándida melinii (Jorgensen).
Núm. 7.....	Torulopsis colliculosa.
Núm. 10.....	Torulopsis kefir (Beijerinck).
Núm. 13.....	Saccharomyces heterogénicus.
Núm. 14.....	Rodotórula minuta.
Núm. 15.....	Cándida rugosa.
Núm. 18.....	Rodotorula glútinis (Fres).
Núm. 28.....	Torulopsis holmii (Jorgensen).
Núm. 29.....	Torulopsis colliculosa.
Núm. 35.....	Cándida albicans (Berkhout).
Núm. 45.....	Torulopsis molischiana (Zikes).

La primera transformación espontánea de levadura en bacteria tuvimos ocasión de observarla cuando intentamos transferirla del tubo de Löwenstein, en el que había crecido durante dieciocho meses, al mismo medio de cultivo y a Sabouraud; al hacerlo, después de veinticuatro horas de incubación a 37°, vimos que crecía solamente un bacilo capaz de formar un pigmento rojo, tiñendo de este color a toda la superficie del medio a medida que lo cubría. Más tarde comprobamos que el pigmento se forma si los tubos de cultivo se mantienen tapados exclusivamente con tapón de algodón; pero si, al efectuar la resiembra, se les pone además el de goma, no se produce. La sorpresa que nos causó el ver crecer a un bacilo en lugar de la levadura no fué menor al cerciorarnos

que se trataba de un cultivo puro, y por ello la posibilidad de una contaminación —que en un principio se nos ocurrió para explicar los hechos— apenas tenía fundamento. Al hacer una extensión del tubo primitivo de donde tomamos el material para hacer las resiembras (tinción de Gram), vimos al microscopio numerosos bacilos Gram-positivos, levaduras deshechas, algunas —muy pocas— normales, y otras formando pseudomicelio, que al teñirse era Gram-positivo. Así, pues, de haber contaminación, se produjo ésta en el tubo de donde se tomó el material para la resiembra, que, como hemos dicho, estaba cerrado con tapón de algodón, además del de goma correspondiente. De todos modos, la explicación no era satisfactoria y las preguntas quedaban sin respuesta.

¿Por qué no había colonias aisladas de bacilos, sino que éstos estaban mezclados con las levaduras en sus mismas colonias?

¿Por qué todas ellas tenían el aspecto de levaduras típicas cuando en su gran mayoría eran bacilos?

¿Por qué no se desarrollaban las levaduras al transferirlas a medio fresco? Todos los intentos de conservarlas, sembrándolas en medios aptos para su crecimiento, han sido inútiles; la levadura se había extinguido. De momento, no nos fué posible observar si el bacilo inhibía el crecimiento de la levadura, pero algún tiempo después vimos que no había tal inhibición.

La segunda de las levaduras con la que trabajamos, levadura núm. 28, procedente de un tubo de Löwenstein, con verde de malaquita como colorante, la sembramos en placa de Sabouraud y fué incubada a 37° el día 17-II-50; dos días más tarde se diferencian dos clases de colonias, ambas de levaduras, pero de diámetro desigual, —5 y 3 ml. aproximadamente; de las que tenían mayor diámetro se destaca una colonia que llegó a alcanzar 9 ml. a los cuatro días de incubación. Hecha una extensión vimos que había pseudomicelio Gram-negativo, muchas levaduras deshechas y algunas que nos parecieron en estado normal. Días después, habiendo permanecido la placa en la estufa a 37°, adquirió toda la colonia un color rosado carne. Sospechamos que algo anormal había ocurrido; el microscopio nos puso de manifiesto la existencia de abundantísimos bacilos esporulados y «restos» de algo que habían sido levaduras. Como en el caso citado, la aparición de bacilos se asociaba a la formación de pigmento, que a los dos días era francamente rojo. Con un asa de platino tomamos abundante material para sembrar en nuevo medio

de Saboureaud y en agar-malta; dieciocho horas después, las colonias hijas eran de bacterias, y nada había que recordara a las levaduras.

Menos fácil era ahora interpretar el fenómeno como una contaminación, pues, de haberla, debía de haberse producido en una sola colonia de levaduras, que atrajo nuestra curiosidad y nuestra especial atención por su sobresaliente desarrollo —9 ml—.

El bacilo, una vez aislado, respondía a los mismos caracteres que los obtenidos en la primera transformación ya mencionada, y, sembrándolo junto con las levaduras de una de las colonias grandes de la misma placa, crecían bien ambos organismos en el mismo tubo, sin que se inhibieran.

Todos estos detalles nos indujeron a pensar en la realidad de la transformación levadura-bacteria que hacía tiempo esperábamos. Nos propusimos conseguirla de un modo experimental y en un tiempo más breve.

Las levaduras primeramente ensayadas fueron las números 28, 9, 6, 35; éstas eran, por entonces, las únicas que formaban la colección.

Una vez sembradas en Löwenstein con colorante, cerrados los tubos con algodón y tapón de goma, después de incubadas durante cinco días a 37°, las conservamos a temperatura ambiente ocho meses. El tiempo transcurrido para que la transformación se realizara espontáneamente era corto —la primera de las transformaciones había necesitado dieciocho meses—, pero con la esperanza de ver alguna alteración o modificación en las células fúngicas hicimos extensiones. Una tinción de Gram nos permitió ver que las células estaban muy deshechas y con un tamaño mayor al normal; parecía que allí había una profunda modificación; sin embargo, no habíamos logrado nada nuevo. Pensando que en el complejo medio de Löwenstein podía existir algún factor que favoreciese el paso de levadura a bacteria, decidimos resembrarlas en el mismo medio por si tal factor estimulante estuviera agotado en el cultivo viejo y precisara ser renovado. Nuestro intento de adelantar por este procedimiento la transformación no dió resultado; a las cuarenta y ocho horas el cultivo tenía el aspecto normal y las colonias, vistas macroscópica y microscópicamente, respondían a las mismas características; era preciso buscar otras substancias ajenas al medio de Löwenstein. Entre tanto, conservamos los cultivos en la estufa de 37° unos veinte días, y al ir a retirarlos observamos que en uno de los tubos, levadura núm. 35, se había producido digestión del medio y las colonias de levaduras tenían un aspecto especial; al hacer

una extensión, nos extrañó su consistencia viscosa; luego vimos en el campo microscópico un gran número de largos bacilos con algunas levaduras, como siempre, deshechas.

Cuando destapamos el tubo, notamos un fuerte olor a SH_2, y este gas nos dió la clave del problema. Relacionando la necesidad del tapón de goma para que se realizara la transformación —que proporciona un cierre casi hermético—, con la producción de SH_2 —gas eminentemente reductor— esperamos encontrar una causa determinante de aquélla, si bien sólo se trataba de una de las cuatro levaduras ensayadas.

El bacilo, una vez aislado, tenía las características de los que se consiguieron en las transformaciones espontáneas antes citadas: pigmento rojo en Löwenstein y Sabouraud, siempre que el tubo se mantenga tapado con tapón de algodón, es decir, relativamente aireado; careciendo de este pigmento si, además, se le pone el de goma; las colonias se adhieren al medio cuando se siembran sobre Löwenstein o agar común; esporulado a los tres o cuatro días de crecimiento; diámetro transverso, 0,66 micras; longitudinal, muy variable; Gram-positivo.

En vano intentamos reproducir el hecho; no se produjo ni la digestión del medio con producción de SH_2, ni, por consiguiente, la transformación. Ante este resultado, y para favorecer el paso, optamos por proporcionar a las levaduras el gas reductor. La técnica es como sigue: Los tubos de Löwenstein fueron sembrados con las levaduras números 28, 6 y 9. Dejamos de trabajar con la 35 por parecernos demasiado apta para el cambio; más adelante, los hechos nos habían de demostrar que nuestra suposición no tenía fundamento. Una vez sembrados los tubos, se hizo llegar a ellos una corriente de SH_2, a través de una pipeta Pasteur, estéril, para obtener una atmósfera de este gas, y se cerraron con algodón y tapón de goma. Seguimos el mismo procedimiento con los empleados como control, sin sembrar, y todos ellos pasaban a la estufa a 37°. Veinticuatro horas después, el tubo que contenía la levadura núm. 28 dió resultado positivo, en parte...; decimos en parte porque, a pesar de verse al microscopio bacilos con abundantes levaduras, no nos fué posible aislar aquéllos; al resembrarlos en un nuevo medio de cultivo no crecían, pero sí lo hacía la levadura. Probablemente —pensamos entonces—, un exceso de gas produjo, al mismo tiempo que la transformación, la muerte del organismo engendrado, o también una deficiencia pudo restar estímulo

eficaz, anulando la reproducción de la bacteria, pues, como hemos dicho, las levaduras eran abundantes y se multiplicaban en las resiembras.

En todos los casos hasta ahora mencionados, estas levaduras procedían de los tubos de Löwenstein sembrados el 21-III-50, cerrados con tapón de goma; es decir, cultivos viejos y poco aireados, circunstancias favorables a nuestros intentos.

Es fácil darse cuenta que el procedimiento empleado para proporcionar al cultivo el SH_2 —sin haber hecho previamente el vacío en los tubos— no permitía obtener todo el rendimiento deseado en cuanto a su acción reductora. Nuestro afán era burbujear el gas en el mismo medio; pero en el de Löwenstein, si queríamos hacerlo, tenía que ser antes de su tindalización, o sea antes de coagularse, y, por consiguiente, el tiempo necesario para ello, así como la elevada temperatura, eran causa de que el hierro precipitara. Solucionamos el inconveniente usando un medio sin huevo y líquido: el A. III, en cuya composición entra extracto de patata, portador del factor X, que desempeña un importante papel en los fenómenos respiratorios de las células. Este medio lo habíamos ensayado otras veces con la misma finalidad y, aunque no fué del todo eficaz, no lo desechamos. Al recurrir de nuevo a él, introdujimos una ligera modificación —de acuerdo con la experiencia adquirida—, que consistió en hacer burbujear el SH_2 unos treinta segundos hasta tomar un color verdoso. Como en el caso anterior, el gas se hace llegar al tubo a través de una pipeta Pasteur estéril. Se procede luego a sembrarlos e incubarlos a 37°.

Medio A. III.

Extracto de patata	100 c. c.
Peptona seca Merk	1 gr.
Glicerina	4 c. c.
Glucosa	1 %

Con este medio logramos la primera transformación experimental de levaduras en bacterias en el término de treinta y seis-cuarenta y ocho horas.

Las levaduras transformadas fueron las núms. 28, 9 y 6; la levadura 35, en las mismas condiciones, no ha sufrido alteración ninguna.

Al microscopio de fase pudimos ver las levaduras repletas de bacilos

en su interior —hasta cinco en algunas de ellas—, moviéndose esforzadamente dentro del limitado recinto en el que se hallaban y entrecruzándose unos con otros. De la mayor parte de las levaduras quedaba, como único vestigio de su existencia, nada más que la pared celular rota; todo su contenido interno había salido fuera, bien en forma de bacilos o en granulaciones móviles del tamaño de unos cocos.

No es fácil captar este momento de tránsito; por lo general el paso levadura-bacteria es demasiado rápido para poder seguir con el microscopio todas las fases intermedias de la transformación.

El experimento se ha repetido muchas veces con resultados siempre positivos para las levaduras núms. 28, 6, 9 y 7, sembrada posteriormente. La 35, en las mismas condiciones, resistió todos nuestros intentos; hasta el presente no nos fué posible transformarla en ninguno de los medios empleados.

Una vez conseguida la transformación experimental en el medio A. III con SH_2, ensayamos otros en cuya elaboración entraran factores capaces de crear un ambiente reductor, evitando de este modo el burbujeo del gas, camino fácil para una posible contaminación a pesar de nuestros cuidados.

El nuevo medio empleado es la A. IV, cuya composición es como sigue:

Medio A. IV.

Extracto de patata ... ... 75 c. c.
Extracto de levadura ... ... 25 »
Peptona seca Merk ... ... 1 gr.
Glicerina ... ... 4 »
Agar, cantidad suficiente.
Esterilizar a 115 grados durante media hora.

Se sembraron en este medio las levaduras núms. 6, 7, 9, 28 y 35; a las veinticuatro horas se habían transformado las 6, 9 y 28. La 7 y 35 no lo han hecho; el protoplasma de sus células, visto al microscopio, no denotaba ningún indicio de un próximo cambio.

Como hemos dicho anteriormente, las levaduras procedían siempre de cultivos viejos en tubos con medio Löwenstein, cerrados con algodón y tapón de goma.

Sembramos también cultivos más jóvenes de las mismas levaduras conservadas en Saboureaud, y se obtuvo el mismo resultado.

Después de esta prueba con el médio A. IV abandonamos el empleo del A. III con SH_2, por sernos muy engorroso y menos práctico.

Se sembraron en él nuevas levaduras:

La levadura núm. 18, que dió la transformación a las cuarenta y ocho horas de haber crecido en el medio. Micro. núm. 4.

La levadura núm. 13 y la 15 a las veinticuatro horas.

La 45 se transforma al hacer la resiembra en el mismo medio, después de haber crecido tres días en un primer tubo con dicho medio.

Antes de continuar aclaramos que al mismo tiempo de sembrar las levaduras en el medio de transformación —cuya esterilidad se comprueba previamente manteniéndolos cuarenta y ocho horas en la estufa de 37 grados—, con el mismo material que queda en el asa, además de hacer al final de las siembra extensiones para ver al microscopio, se siembran tubos de agar común y Saboureaud, que se incuban con los que contienen los medios de transformación. Procediendo así, nos cercioramos de que la levadura no está contaminada, pues de ocurrir, el bacilo debe crecer también en Saboureaud y en agar común porque, una vez aislado, se desarrolla bien en estos medios. No creemos necesario decir que cuando la transformación tiene lugar en alguno de los medios elaborados ex profeso, no se ha visto nunca un solo bacilo en los corrientes utilizados como control. De este modo el trabajo se hizo con todas las garantías que están a nuestro alcance.

En el transcurso de nuestro trabajo, empleamos y elaboramos otros medios que son modificación de éstos, e incluso el medio A. V, que el profesor Socías usó tan eficazmente en uno de sus más recientes trabajos (69).

Otros medios empleados.

A. IV con acetona y creatinina.

El medio es, pues, el mismo A. IV, añadiendo luego la acetona al 0,5 por 100 y la creatinina al 1 por 100. Se han sembrado en él las levaduras núms. 18, 2, 6, 7, 9, 10, 28, 29 y 35 procedentes de cultivos en medios de Saboureaud. Crecen como levaduras los cinco primeros días; al sexto dan la transformación las siguientes: 6, 9, 10, 18 y 28. La levadura 29 tardó siete días en transformarse; las demás no lo han hecho.

Medio A. V.

Caldo común	100 c. c.
Colina	0,5 gr.
Glucosa	1,0 gr.
Agar, cantidad suficiente.	

Levaduras sembradas: 2, 6, 9, 18, 28, 35. Después de haber crecido en él durante tres días, se transformaron sólo la 2 y la 28.

Medio A. VI.

Caldo común	100 c. c.
Vitamina B_2	15 » de una solución saturada
Glucosa	1 gr.
Agar, cantidad suficiente.	

Las levaduras ensayadas han sido: 7, 9, 28; transformadas:: 7 y 9. La colina y glucosa, así como la vitamina B_2, se esterilizan por filtración.

Resumen

Levaduras sembradas	Levaduras transformadas
Medio A. III con SH_2	
Lev. 6-7-9-28-35	6-7-9-28.
Medio A. IV.	
Lev. 6-7-9-13-15-18-28-35-45.	6-9-13-15-18-28-45.
Medio A. IV, con acetona y creatinina.	
Lev. 2-6-7-9-10-18-28-29-35.	6-9-10-18-28-29.
Medio A. VI.	
Lev. 7-9-28.	7-9.
Medio A. V.	
Lev. 2-6-9-18-28-35.	2-28.

Las levaduras números 14 y 35 no hemos podido transformarlas en ninguno de nuestros intentos.

Modo de realizarse la transformación

Cuando usamos para la transformación medios líquidos podemos saber el momento en que aquélla tiene lugar.

En los tubos o matraces sembrados crecen las levaduras normalmente en las primeras catorce-dieciocho horas; en algunos casos, durante ocho días o más, pero no es frecuente. El cultivo se desarrolla bien en todo el fondo, formando una capa que puede llegar a cubrirlo. La transformación se hace visible al aparecer una membrana ligera en la superficie del medio; al principio es blanquecina, delgada, y así se conserva cuatro o cinco horas. La presencia de esta membrana nos indica que existen bacilos y, por tanto, que la transformación se realizó. Pasados estos primeros momentos el crecimiento es muy rápido, la membrana se engruesa y adquiere un pigmento rosado que con el tiempo se vuelve rojo-violeta. Los bacilos, que crecían sólo en la superficie cuando está cubierta por un velo delgado, se desarrollan luego por todo el medio, llegando a desaparecer las levaduras.

Microscópicamente, sí están próximas a transformarse, su núcleo y protoplasma está plagado de gránulos móviles y refringentes; el pseudomicelio es abundante, y en algunos casos afortunados, los propios bacilos, perfectamente desarrollados, podemos verlos con el microscopio de fase en el interior de las levaduras.

Cuando los medios son sólidos el proceso es semejante, pero tiene ciertas particularidades: crecen primero las levaduras, y al empezar la transformación comienza ésta por el fondo de algunas colonias en contacto con la superficie del medio; luego se propaga a todas las demás rápidamente.

Las colonias blancas, opacas, mates, lisas, se hacen pronto rugosas; la superficie se vuelve abullonada, brillante y adquiere pigmentación roja, que al envejecer se hace violeta.

La microfotografía núm. 1 corresponde a la levadura 28, sembrada en placa de A. IV. Claramente se distinguen las colonias de levaduras normales —destacadas con la letra N—, pero en las demás, en su base, se aprecia un borde irregular —señalado con flecha— más brillante que el resto de las colonias y con repliegues que tienden a extenderse por la superficie; al suceder esto las colonias de levaduras dejan de ser tales

para estar formadas por bacilos y material de desecho procedente de la desintegración de las células.

En un frotis de una de estas colonias, al empezar a transformarse —micro núm. 2—, vemos las levaduras con el protoplasma granuloso y, en su mayor parte, rotas, granulaciones fuera de la membrana celular y bacilos más o menos abundantes, según de donde proceda el material con el que se hizo la extensión, de la base de la colonia o de su superficie. La micro núm. 3 de la levadura 9, a las treinta horas de haber sido transformada en el medio A. IV. La núm. 4 pertenece a la 18, que al cultivarla en este medio dió dos clases de bacilos: uno grande y grueso y el otro pequeño, delgado, como los que hasta ahora hemos visto; además, algunas formas intermedias entre levadura y bacilos, de las que nos ocuparemos más adelante. La levadura núm. 7, cultivada en A. IV —micro núm. 35—, en los primeros momentos de su transformación son muy escasos los bacilos, pero en los campos microscópicos ya se ven las levaduras rotas y algunas bacterias.

En los medios líquidos la transformación es total, desapareciendo las levaduras en un tiempo más o menos largo. La levadura 6, en A. III con SH_2, se transforma rápidamente (micro 6). En las primeras dieciocho horas de haberse realizado el paso se encuentran células y granulaciones de diferente tamaño que proceden de aquéllas; veinticuatro horas después no nos fué posible hallar una sola de dichas células.

Cuando los medios son sólidos y las siembras se hacen en placa Petri, si las colonias están bien aisladas, alejadas unas de otras, es frecuente que alguna quede sin transformarse o lo haga con bastante retraso en relación con las primeras.

Hemos intentado averiguar exactamente el factor o factores que determinan el paso levadura-bacteria y, pese a nuestro esfuerzo, no podemos decir más que lo que sigue:

Los primeros ensayos nos indujeron a admitir como factor primordial el SH_2 en su papel reductor o mejor como desencadenante de fenómenos biológicos relacionados con procesos óxido-reductores capaces de alterar el metabolismo de la célula, pero hay otras substancias, como la vitamina B_2, la colina, que han servido para transformar algunas levaduras y ninguna relación química tienen con aquel gas.

El medio A. III. con SH_2 reduce el licor de Fehling y las soluciones de

permanganato potásico; el medio A. IV también tiene carácter reductor, pero menos acentuado que el primero.

El envejecimiento de los cultivos es también un factor importante; se consiguen transformaciones en cultivos de tres o cuatro días, pero es más fácil lograrlas cuando tienen tres o cuatro meses.

Nos interesaba conocer la acidez o alcalinidad del medio; para ello se midió cuidadosamente el pH, y la conclusión es que no ejerce ningún papel notable: el medio A. III con SH_2 tiene un pH de 4; el A. IV, de 7. Tanto en uno como en otro hemos conseguido la transformación, y nunca se obtuvo ésta en los medios sencillos del laboratorio en un período de tiempo tan breve.

Todas las levaduras de un mismo cultivo no gozan de la misma facilidad para transformarse; las hay especialmente aptas, y suponemos que éstas influyen en las más resistentes —a modo de estimulantes—, ejerciendo su acción de una manera muy activa y rápida.

Es decir, la transformación no se produce al mismo tiempo en todas las colonias de cultivo, pero una vez que empieza se propaga rápidamente a todas las demás.

Un dato curioso, y que nos llamó siempre la atención, es el que, las primeras colonias transformadas —cuando el paso tiene lugar en cultivos en tubo-inclinado— se localizan en el fondo de estos tubos, y, por tanto, las primeras en hacerlo son las que están en la parte más baja del cultivo, en contacto con el agua de condensación del medio, y si a esto añadimos que cuando lleva varios días entubado, y, en consecuencia, está demasiado seco, la transformación es más difícil y tardía —pudiendo no producirse—, deducimos una posible influencia favorable del ambiente húmedo.

Pero hay más: todos estos datos mencionados, y los que involuntariamente pasarán desapercibidos, deben representar aislados, en el fenómeno de la transformación, un papel secundario. Es muy posible que su acción conjunta sea la que incite a la levadura al cambio, a variar su metabolismo en otro sentido, obligándola a sintetizar nuevas substancias —previa formación de fermentos especiales para el caso—, que por sí actuarían eficazmente en el proceso. De este modo puede explicarse la transformación total en los medios líquidos y la parcial en los sólidos en placa de Petri, donde la difusión encuentra más dificultades, así como la

irregularidad en el tiempo necesario, que dependería de la elaboración de esta substancia o substancias.

Un análisis del líquido metabólico nos sacaría de dudas, y es a la Bioquímica a quien toca resolver el problema.

Antes de exponer las conclusiones a que hemos llegado en la primera parte de nuestro trabajo, vamos a referirnos a algunos otros hechos en Alemania sobre el mismo tema y que conocimos cuando ya el nuestro estaba terminado.

Fué el Prof. Schanderl, del Instituto Botánico de Geisenhein, quien en su visita al Instituto «Jaime Ferrán» nos puso al corriente de las experiencias que actualmente se realizan en Alemania sobre transformación. De uno de sus trabajos tomamos algunos de los datos aportados a este capítulo.

En 1907, J. van Nest publica en Rotterdan un artículo acompañado de dibujos en el que dice que, de las especies de levaduras tórulas, en ocasiones pueden salir de su membrana plasmática ciertos gránulos interpretados por él como falsos núcleos capaces de desarrollarse por sí solos y de dar levaduras pequeñas (70).

En 1930, Enderlin (71) estudia la transformación del Aspergillus niger en bacterias. En frases de Schanderl el resumen del trabajo es el siguiente:

«Enderlein describe hasta los más mínimos detalles de las diferentes formas de la transformación de los condriosomas de los Aspergillus en bacterias, con la única diferencia de que él no habla de condriosomas, sino que los divide en formas diferentes como, por ejemplo, Protitos, Symprotitos, Condritos, Endocondritos, etc. El observó los fenómenos de copulación de los «condritos»; habló en una ocasión de un modo muy claro de la «danza sexual de los condritos»; describió, además, cómo los extremos de las ramas laterales de las hifas se hinchan frecuentemente para formar unas vesículas en forma de salchichas, que están llenas de un gran número de «condritos» y denominados por él «condriocistos». Los condriocistos explotan en algunos casos y son expulsados gran cántidad de condriosomas amontonados desordenadamente.»

«Según la definición de Enderlein, las levaduras fungosas citadas son consideradas como condriocistos, pues no contienen núcleo, sino una infinidad de condriosomas. El fenómeno observado por Enderlein en el As-

pergillus niger está de acuerdo con el observado por mí en los Mucoráceos. Enderlein consideró las bacterias encontradas en condritos del Aspergillus niger —ácido-resistentes— como verdaderos bacilos de la tuberculosis. En Enderlein nosotros encontramos por vez primera la idea de que una bacteria puede ser meramente una forma del desarrollo de un moho. El descubrimiento de Enderlein, hasta ahora, era el único en la literatura.»

Actualmente, la obra de este investigador está en nuestro poder, pero su descomunal tamaño, sus ideas un poco confusas, además de estar escritá en alemán, nos ha imposibilitado, por ahora, hacer un análisis completo por nuestra propia cuenta.

En el mismo año, Vaclao Jonas publica un artículo titulado: «Nuevo método de multiplicación de las levaduras secas cultivadas y la aparición de nuevas formas de levaduras.» (72.)

El autor observó que de las levaduras, por un lugar preestablecido de la membrana o desapareciendo ésta totalmente, pueden salir al exterior ciertos gránulos fáciles de aislar de las levaduras mediante filtros de una micra de diámetro. Jonas dice: «A la maduración de los corpúsculos sigue la salida hacia el exterior de la célula.

Esto se verifica de dos maneras: En el primer caso aparecen en la célula unos pequeños abultamientos, que se abren al romperse la membrana celular o intracelular y los gránulos pueden salir fuera.

El segundo, que dura mucho más, consiste en que las membranas celular e intracelular se rompen por igual por todas partes y los corpúsculos esparcidos se separan finalmente porque el conjunto se ramifica.

Ha conseguido cultivos abundantes en agar o gelatina cuando la superficie del medio está bastante húmeda y mejor si los medios son líquidos: caldo común, caldo de judía, etc., y ayudado todo ello por la acción del calor o del formol para destruir la célula. Los gránulos aislados pueden permanecer en estado de cocos o fusionarse para dar bacilos cortos. Por esta razón, afirma, no debe considerarse estéril un medio de cultivo con levaduras que haya hervido durante una hora, porque, sin duda, contiene formas pequeñas viables capaces de reproducir las levaduras normales o bacterias al transferirlas a un medio de cultivo fresco.

En el mismo trabajo escribió: «La muerte de la levadura, según las experiencias descritas, no significa, de ninguna manera, la pérdida de la

vida, puesto que el plasma de la célula «muerta» puede vivir en condiciones desfavorables y reproducirse nuevamente.»

Fink y Berwald (73) dieron a conocer una transmutación de especies de Penicillium en levadura. Ellos habían observado casualmente tal transformación y para repetirla ensayaron 1.000 cultivos, de los cuales 20 reprodujeron el fenómeno.

Las levaduras obtenidas tenían poder fermentativo.

En el mismo año, G. Baltau (74) observa la salida de gránulos de las levaduras, expresándose así: «Los corpúsculos se dirigen hacia la membrana celular, la atraviesan cada uno por separado y permanecen cierto tiempo sobre la superficie, dándole el aspecto de abolladura. Luego se desprenden... Los corpúsculos pueden también abandonar la levadura a través de un orificio que se produce en la membrana de algunas células. Una sola vez conseguí aislar estos corpúsculos y cultivarlos en mosto fresco y en la tercer resiembra regeneraron la levadura normal.»

Concluye Baltau diciendo que las levaduras «pueden presentarse, al parecer, en forma de bacterias.»

Kowrowtzawa, en 1903 (75), habla de la entrada de bacterias lácticas en las mismas células y supone que éstas podían ser la causa de la enfermedad de las levaduras prensadas. Nos parece que esta observación del investigador puede tratarse de una transformación que no supo interpretar; por ello la consignamos aquí.

Expuestos estos datos, entramos en el análisis de la obra de Schanderl, cuyo primer trabajo, publicado en el año 50 (76), comienza así:

«Dentro de las especies Múcor existen clases que pueden cultivarse en medios de nutrición. Sobre los medios sólidos se desarrolla una mezcla de aire caliente y un gran número de esporangios.»

«Los blastoconidios no aumentan por división, sino por germinación. En la práctica de los laboratorios de fermentación se conocen también como levaduras «múcor» porque pueden confundirse fácilmente con las levaduras. Los múcor-oidios y las levaduras «múcor» son excepcionalmente apropiadas para los estudios condriosómicos. Por un lado se puede estudiar, con ello, la influencia de la alimentación, rica en nitrógeno, sobre el desarrollo del condriosoma y, por otro lado, la influencia del pH en el desarrollo de los condriosomas segregados o de aquéllos que por plasmoptisis se encuentren en el exterior de la célula.»

«Las sales de amoníaco, los nitratos, la asparagina y la alanina producen un abundante desarrollo del condriosoma.»

«Los blastoconidios y los oidios, así como las hifas alimentadas con nitrógeno, están llenos de un número extraordinariamente abundante de condriosomas, que han alcanzado un gran desarrollo.»

«En los medios de nutrición líquidos, pero también en el caso de los oidios, hifas y blastoconidios, que se desarrollan en cuerpos de nutrición consistentes, tiene lugar, con una nutrición rica en nitrógeno, una abundante segregación de condriosomas. A un pH entre 4 y 4,5 permanecen fuera de la célula madre con la misma configuración que tenían en ésta. Si, por el contrario, el pH del medio líquido o semilíquido envolvente es superior a 5, los condriosomas adoptan la configuración de bacterias.»

«Los condriosomas más pequeños se denominan «microsomas» para diferenciarlos de los mayores. Ya dentro de la célula se encuentran frecuentemente microsomas que se fusionan entre sí y que aparecen como microcos o en forma de pesas de bolas. En el exterior de las células continúa todavía la fusión de los microsomas formando bastoncitos. Durante este proceso de regeneración, los bastoncitos contienen, aparentemente, una membrana, y si el medio es líquido, se forman flagelos, que empiezan a propagarse con lentitud al principio, y más tarde desplazando una gran actividad. En esta fase los condriosomas con capacidad vital independiente pueden separarse del hongo empleando los métodos usuales de separación y dilución, y cultivarse separadamente.»

El autor continúa: «He designado este proceso, en contraposición a la regeneración artificial, que se describirá más adelante, con el nombre de autorregeneración de los múcor-condriosomas. Esta regeneración tiene lugar a un pH superior a 4,5-5 en cualquier medio líquido de alimentación; en el agar cuando no es demasiado consistente o no está excesivamente deshidratado, y en la nutrición normal de la mayor parte de las especies de múcor.»

«Cuanto menos nitrógeno está presente, tanto más largo es el proceso de segregación y autorregeneración de los condriosomas. En los casos de Múcor subtilisimus, Múcor racemosus, Múcor siratius, Múcor manchuricus y Múcor pyriformis, al cabo de cinco días el proceso se encuentra en plena actividad empleando un medio nutritivo líquido o semilíquido a 25-32°.

Más adelante, Schanderl dice: «La segregación de los condriosomas

tiene lugar no sólo en las mucoráceas, sino también en los Aspergillus.»

En un trabajo publicado en el año 51 (77) por el mismo autor, describe tres modos de transformación de mohos en bacterias, del siguiente modo:

«Se trata ahora de averiguar el ciclo de desarrollo de las bacterias desde su origen. Se observaron tres tipos de desarrollo:

1) Salida al exterior del plasma por plasmoptisis, o bien la ruptura de las hifas jóvenes. En los medios líquidos sucede generalmente que las células jóvenes se rompen. En el protoplasma que sale hay una gran cantidad de condriosomas aislados o formando grupos. Luego, fuera de la célula, éstos crecen y evolucionan, uniéndose dos unidades esféricas para dar cortos bacilos móviles.

2) Activa salida del condriosoma a través de la membrana de células jóvenes. Los condriosomas, en el crecimiento, son transportados al extremo de las hifas jóvenes por medio de una corriente protoplasmática. En el exterior parecen separarse por medio de movimientos propios.»

«Así, pues, se puede observar que nadan en contra de la corriente general. El movimiento rápido hace salir frecuentemente todos los condriosomas que se han quedado en las vacuolas celulares; se puede ver cómo producen una irritación en la membrana celular, que forma por medio de este estímulo una evaginación en la que se introducen los condriosomas. De este modo se originan las evaginaciones laterales de las hifas en la fase mayor del crecimiento. Los condriosomas atraviesan la membrana cuando ésta no se opone a dicho empuje con una dilatación o evaginación. Al principio del trabajo denominé «condriosoma excreción» a este fenómeno observado continuamente en hifas jóvenes. Sin embargo, hoy, esta denominación no me parece buena, porque indica que los condriosomas tienen un papel pasivo (excernere = separar, excretar). En realidad, según todas las apariencias, juega un papel activo en este fenómeno. Siendo así que tienden a salir, es más correcta la denominación «condriosoma-secesión» (secedere = salir). Los condriosomas salidos de las células prosiguen su desarrollo extracelular.»

«En las especies de múcor sucede esto de tal manera que ellos conservan la forma de condriosomas en los medios ácidos de pH inferior a 4, y producen formas clásicas de bacterias a pH superior a 4. Estas se hacen tan numerosas que no hay inconveniente en aislarlas del cultivo de mohos y hacerlas crecer separadamente.»

«En los cultivos de mucor en agar y gelatina se puede reconocer macroscópicamente la fase «condriosoma-secesión», porque el interior de la colonia empieza a ponerse amarilla. El color se manifiesta tan pronto como los condriosomas pasan a ser formas bacterianas en gran número.

3) La transformación de toda la hifa en bacteria. En los mohos Mucor espinosus v. Tieghem vi que, cultivados en medios ricos en nitrógeno, por ejemplo, en caldo de judías, por la influencia de su propio metabolismo, generalmente abandonan el estado de hifa al alcanzar una determinada edad fisiológica... Toda la planta pasa morfológicamente, por una especie de autolisis, de la fase hifa a la fase bacteria.»

En cuanto a las levaduras, los fenómenos observados los divide en cuatro grupos:

«1) Salida de los gránulos por un sitio cualquiera de la membrana celular.

2) Salida de los gránulos por un lugar preestablecido de la membrana celular.

3) Salida de todo el contenido por medio de la desaparición de la membrana celular, y transformación paulatina de todos los gránulos celulares en bacterias.

4) Desarrollo de los gránulos en las ascas (juntamente con las esporas) que no han sido utilizados para la formación de esporas y que en la desintegración pasan a ser bacterias.»

«En los casos 1) y 2), los gránulos pueden llegar a desaparecer total o parcialmente de la célula de la levadura. Si han salido todos los gránulos, la célula ya no puede seguir viviendo. En el caso 1) se incluyen todas las especies que pueden formar micelio muy pronto; a los dos o tres días de formarse el micelio, la secesión de gránulos está ya en pleno funcionamiento. Entonces las células se desarrollan abundantemente. Sin embargo, se producen en los micelios viejos células estables que reciben unos pocos gránulos. Cuanto menos reciben de la célula madre, tanto más pequeña es la nueva célula. El número menor es un gránulo. Así se producen las llamadas células enanas o «Kleinforn».

«El caso 2) aparece tan pronto como el caso 1). Sin la intervención química, el caso aquí estudiado necesita dos meses y medio a tres meses. Antes de este tiempo no pudo verse nada sospechoso en las levaduras en cuestión. Se ramifican en la forma habitual. Luego empiezan a copularse los gránulos en las células viejas, de tal modo que aparecen diplo-

cocos y tetradas. Los diplococos empiezan a moverse en las células. Finalmente, muestran los movimientos propios. Al mismo tiempo empiezan a transformarse las formas celulares. Las células son angulosas piriformes o, por el contrario, terminan en punta.»

«En este lugar se origina normalmente un orificio en la membrana y se pueden ver cómo los diplococos abandonan la célula por este lugar.»

«En el exterior de la célula, un par de gránulos se fusionan para dar lugar a unos bacilos cortos que empiezan a dividirse profusamente, por lo cual aparecen, bajo ciertas circunstancias, bacilos unidos por largas cadenas.»

«Tan pronto salen de la célula las parejas de gránulos, se separan, y es fácil aislar las bacterias y cultivarlas. Las «bacterias-levaduras» no son aptas para la fermentación alcohólica, sino que producen ácido láctico a partir de la sacarosa y de la glucosa.»

«Todavía no se ha obtenido la transformación inversa de «bacterias-levaduras» en formas típicas de levaduras. Sin embargo, no está excluída la posibilidad de tal transformación; es solamente cuestión de investigación.»

«El caso 3), es decir, la transformación en bacterias de todo el contenido de la célula, se presentó en mis experiencias solamente después de intervenciones físicas o químicas.»

«Las ayudas químicas consistieron en la adición de uno o dos gramos de sulfito sódico o de 300 a 500 mg. de SO_2 por litro de mosto, y, finalmente, el desplazamiento del pH desde 3 a 7 ó 10,5 mediante CO_3HK.»

«La ayuda física, en un tratamiento con ondas suprasonoras. Las levaduras pequeñas y redondas son más resistentes a las ondas suprasonoras que las grandes; por esta causa fueron las preferidas en mis experiencias las grandes células en forma de limón de Saecharoycodes Ludwigii Hansen, que con los ultrasonidos se rompen por la mitad y el contenido celular sale al exterior.»

«Cuando se combinan los tratamientos físicos y químicos, la fase bacteria se logra antes que al emplear uno de los métodos.»

«Pero también se consigue esto con el tratamiento químico, puesto que en el curso de tres o cuatro meses se libera el contenido celular por un proceso lento que al principio es Gram-negativo y poco a poco va dando cocos y bacilos Gram-positivos.»

«El modo 4) representa el caso de que en la formación de esporas,

sobre todo en los géneros de levaduras Klozeraspora (Niehaus) y Brettanomyces (Kufferath), no se emplea en ello la totalidad de los gránulos, ya que, en lugar de madurar cuatro esporas que se forman al principio, solamente lo hacen una o dos, y el resto de los gránulos abandonan las ascas como si fueran esporas. Como es sabido, la esporulación se consigue en un bloque de yeso estéril. Se ha observado siempre, después de breve tiempo, que ese bloque ya no es «estéril», sino que está «infectado con bacterias». Durante diez años, yo mismo creí que la verdadera causa de la «infección» era la imperfecta esterilización del bloque de yeso, hasta que por el estudio de mi discípulo Agostini sobre Brettanomyces se llegó a la certeza de que el origen de las bacterias extrañas hay que buscarlo en los gránulos celulares y no en la «infección». Cada esporulación implica en toda levadura una división y una agrupación de los gránulos celulares.»

«Las divisiones de los gránulos son síntomas seguros de próxima esporulación, y las agrupaciones permiten predecir si la célula formará dos o cuatro esporas. En los géneros de levaduras mencionados se pueden ver al principio los preparativos para formar cuatro esporas. Sin embargo, sólo llegan a madurar una o dos, mientras que los grupos de gránulos de dos o tres esporas hermanas no continúan el desarrollo y abandonan el asca con las esporas maduras. Fuera de las ascas, los gránulos, copulándose de dos en dos, forman unos bacilos cortos que, según el pH del medio de cultivo, siempre presentan movimiento propio y, como un enjambre, se mueven entre las esporas que germinan.»

En la discusión de los resultados llega a la conclusión de que la célula no es la unidad biológica más pequeña, citando las levaduras como un fenómeno de simbiosis y «precisamente como una reunión de bacterias». «Hasta ahora —dice Schanderl—, nosotros hemos considerado las bacterias, levaduras y hongos solamente desde el punto de vista estático y monomorfológico. Lo que nosotros hemos llamado levadura y hongo no es una planta, sino una fase de un ciclo de desarrollo. La forma planta es solamente un síntoma de la fase correspondiente en la que está. Una misma planta puede por sí sola presentarse en diferentes formas, es decir, fases.»

«Todas las células vegetales con plasma, después de la fase celular, como fase de orden superior, después de la muerte de la célula (sería

mejor decir bancarrota), pasa a la fase bacteria, que es una fase de orden superior.»

Nos parece oportuno transcribir aquí unas líneas de la comunicación que el Prof. Socías hizo en el año 1949, en la que se expresa así:

«Si esta transformación se puede con el tiempo generalizar, entonces habrá que admitir que las bacterias todas, o parte de ellas, tienen su origen en los hongos y no son más que una de sus fases de reproducción.»

DISCUSION

Vemos, pues, cómo en Alemania, sede y raíz de las ideas monomorfistas, impulsadas y alentadas por la Bacteriología médica de Koch, a medida que la ciencia se abre en nuevos y más amplios horizontes, y por ley natural los problemas bacteriológicos se complican cada vez más, van apareciendo trabajos que llevan en sí el ansia de nuevas explicaciones, buscando afanosamente la salida a los problemas planteados; y cómo algunos de ellos, sin pretenderlo, declaran en favor de la doctrina pleomorfista, que está llamada a ser —en nuestra opinión— el punto de partida de la investigación científica actual.

La Bacteriología ha pasado de la infancia, y en plena adolescencia está obligada y capacitada para explorar y conquistar terrenos en los que no es fácil internarse sin correr el peligro de perderse. Actualmente, estas doctrinas tienen sus guías: en España lo fué Ferrán sin proponérselo, y hoy Socías, consciente y seguro; en Alemania, Enderlein, Jonas y Schanderl son los que marcan la pauta de una manera más o menos precisa.

Hemos dicho ya que el trabajo de Enderlein no nos fué posible estudiarlo a fondo; pero, según Schanderl, en él se exponen detalladamente las observaciones que el investigador hizo sobre la transformación del Aspergillus niger en bacterias.

Jonas asegura haber transformado ciertas levaduras en cocos, y que al fusionarse éstos pueden dar bacilos. Las levaduras las hace crecer en medios líquidos preferentemente, y han de sufrir un tratamiento por el formol o por el calor para romper las células.

El trabajo de Schanderl publicado en 1950, un poco confuso, se trata más bien de un conjunto de observaciones. En él asegura que el

factor fundamental en su «regeneración del condriosoma» es el pH; sin embargo, en el publicado en el año 51 —que viene a ser una confirmación de las experiencias de Jonas, ampliado con la descripción de dos nuevos modos de salir al exterior los gránulos de las levaduras— aboga por la intervención química y física para conseguir las bacterias en alguno de los cuatro procedimientos por él estudiados.

Nos interesa señalar que la influencia del pH, factor principal e indispensable en las investigaciones de Schanderl, no desempeña ninguna función en el nuestro. Como hemos dicho, sólo se da la transformación en medios de cultivo especiales elaborados ex profeso.

El habla del condriosoma atribuyéndole la función fundamental en la generación de las bacterias; en nuestro caso, si éste juega algún papel, es secundario, y destacamos la posible intervención del núcleo o núcleos de las células en el proceso, porque, cuando tiene lugar la formación de los bacilos, queda la levadura reducida a la pared externa, que alberga en su interior a los jóvenes organismos.

La teoría de Schanderl concede, pues, a las bacterias un origen exclusivamente citoplasmático, mientras que en nuestro caso suponemos una innegable intervención nuclear.

Schanderl y antecesores describen la formación de bacterias extracélula, mientras que nosotros, en nuestro trabajo, damos a conocer una génesis intracelular.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) En diferentes medios de cultivo especiales, cuya elaboración se da a conocer, hemos conseguido la transformación de 11 levaduras en bacterias, de 13 ensayadas.

2) Describimos los detalles fundamentales del proceso.

3) Exponemos las razones que nos obligan a admitir como factores estimulantes el gas SH_2, en su papel óxido-reductor, u otras substancias con propiedades similares; el envejecimiento del cultivo y la humedad del medio.

4) Comparamos nuestro trabajo con el de otros investigadores y señalamos las características fundamentales que distinguen al nuestro.

5) Destacamos la génesis de las bacterias en el interior de las células micósicas.

ESTUDIO DE LOS BACILOS QUE RESULTAN DE LA TRANSFORMACION HONGO-BACTERIA

Bacilos procedentes de mohos transformados.

Penicillium notatum	n.º 28 da dos bacilos		ME. n.º 28 B. R. n.º 28
Aspergillus anstelodami	n.º 79	» »	ME. n.º 79 B. R. n.º 79
» peniciloides	T. 20	» »	ME. n.º 20 B. R. n.º 20

Penicillium cyclorimus... ...	63	se transforma en	B. R. n.º	63
Aspergillus repens	60	»	» »	60
Sporotricum	76	»	» »	76
Aspergillus peniciloides...	84	»	» »	84
» » ...	86	»	» »	86
» ruber (29)	75	»	» »	75
» »	77	»	» »	77
» versicolor	78	»	» »	78
Penicillium notatum	64	»	» »	64
Aspergillus ruber...	52	»	» »	52
Penicillium notatum	56	»	» »	56
» »	61	»	» »	61
» Esteckii...	32	»	» »	32
Penicillium (43)...	43	»	» »	43
Aspergillus ruber...	59	»	» »	59
» »	57	»	» »	57
Aspergillus ruber...	58	»	» »	58
Penicillium	74	»	» »	74
Aspergillus fumigatus... ...	6	»	» »	6
» niger	88	»	» »	88
Penicillium oxálicum	38	»	» »	38
Moho...	70	»	» »	70

En la lista dada distinguimos dos grupos de bacilos cuyas características morfológicas nos ha permitido en los primeros momentos diferenciarlos en dos grupos: uno integrado por los bacilos que llamamos ME. números 6, 9, 18, 20, 28 y 79, y otro por los bacilos B. R., que son todos los demás.

Los bacilos B. R. se presentan siempre en todos los casos de transformación y parecían corresponder a un bacilo subtilis. Los ME. sólo ocasionalmente se ven mezclados con los primeros, raramente solos y, por su gran tamaño, podían pertenecer a la especie Megatherium.

Estos últimos, decimos, no surgen en todas las transformaciones y por lo tanto no podemos controlar su aparición. Se aislaron por primera vez de una placa sembrada con esporas del Penicillum notatum número 28; más tarde, al aislar la levadura 9, aparece mezclado en una misma colonia con levaduras normales; algún tiempo después fué la levadura 6 quien dió este mismo bacilo, y la 18, al transformarse en el medio A. IV., lo hace en bacilos de los dos tipos. El Aspergillus penicilloides (20) y el amstelodami número 79 en medios aptos para su transformación dan colonias de bacilos ME. y B. R.

Más adelante daremos nuevos datos sobre la ecología de estos bacilos, mientras ahora pasamos a su clasificación.

Clasificación del género Bacillus.

Los bacilos llamados ME. son los que vamos a estudiar primero, y procedemos a su clasificación según la norma dada por «United States Departament of Agriculture» (72). Se distinguen tres grupos:

1) Esporangios no claramente hinchados.

2) Esporangios marcadamente hinchados con esporas ovales.

3) Esporangios hinchados. Esporas esféricas.

Al primer grupo pertenecen los nuestros, y en él tenemos:

a) Esporas ovales tendiendo a cilíndricas; centrales tendiendo a terminales; membrana de la espora fina; esporangios débilmente hinchados si es que lo están; Gram-positivos.

b) Diámetro del bacilo, 0,9 micras o más; el protoplasma de las células crecido sobre agar glucosa o glicerinado presenta vacuolas si se colorea débilmente.

c) Produce ácido con arabinosa o xilosa con nitrógeno amoniacal. No produce acetil-metil-carbiol: B. megatherium.

cc) No produce ácido a partir de arabinosa o xilosa. Produce acetil-metil-carbinol: B. cereus.

bb) 1. Con crecimiento rizoide: B. cereus. Var. micoides.

2. Agente productor del ántrax: B. cereus Var. anthracis.

bb) Diámetro del bacilo inferior a 0.9 micras; el protoplasma de las células crecido sobre agar glucosa o glicerinado se colorea uniformemente.

c) Crece a pH 6; produce acetil-metil-carbinol.

d) Hidroliza la gelatina; produce ácido a partir de la arabinosa o xilosa con nitrógeno amoniacal.

Hidroliza el almidón; produce nitritos a partir de nitratos: B. subtilis.

1) Pigmento negro sólo sobre medios con azúcar: B. subtilis. Var. aterrimus.

2) Pigmento negro sobre medios con tiroxina B. subtilis. Var. niger.

ee) No hidroliza el almidón, no produce nitritos a partir de nitratos: B. pumilus.

dd) No hidroliza la gelatina; no produce ácido a partir de la arabinosa o xilosa: B. coagulans.

cc) No crece a pH 6; no forma acetil-metil-carbinol.

d) Hidroliza la caseína; no produce ureasa: B. firmus.

dd) No hidroliza la caseína; produce ureasa: B. lentus.

Para estudiar la formación de ácido a partir de la arabinosa o xilosa, se preparó el medio siguiente, que es una modificación del de Ayers, Rupp y Johnson (79), según la técnica del «U. S. Departament of Agriculture» (78):

$(NH_4)_3PO_4$	1 gr.
K Cl	0,2 gr.
SO_4Mg	0,2 gr.
Agua destilada	1.000 c. c.
Agar	c. s.

Se ajusta el pH a 7 y se pone como indicador 12 c. c. de una solución de púrpura de bromo cresol al 0,04 por 100. Después de intubar y

de esterilizar al autoclave, se añade con pipeta en cada tubo una solución del azúcar estéril por filtración, en tal cantidad que resulte una concentración del hidrato de carbono al 0,5 por 100. Los tubos se incuban durante una noche, examinándolos por si hay contaminación; una vez inoculados se observa el desarrollo y acidez a los intervalos de tres, siete, catorce y veintiún días.

Observamos que para que crezcan los bacilos en un medio tan pobre es preciso que los cultivos sean, todo lo más, de dos días.

En la prueba de Voges-Proskauer (80) el medio se preparó según la técnica de O Meara (81), publicada también por el U. S. Departament of Agriculture:

Peptona-proteosa	7 gr.
Glucosa	5 gr.
Na Cl	5 gr.
Agua destilada	1.000 c. c.

Como carecemos de peptona-proteosa, la sustituímos por la Merk, sin que por ello se alteren los resultados de la prueba.

Una porción de 5 c. c. de medio de cultivo se reparte en tubos de 18 mm., que se inocularon e incubaron a 32° C. durante dos, cuatro, seis, diez, veinte días. El acetil-metil-carbinol se puso de manifiesto en nuestras experiencias a los cuatro días de incubación, por la presencia de un color rojo en el cultivo al añadir un volumen igual de sosa al 40 por 100 y unos pocos miligramos de creatina.

Controlamos la experiencias con el bacilo c e r e u s de la colección del Dr. Gordon, del «United States Departament of Agriculture», que nos ha sido amablemente cedido.

En la micro número 15, y con las flechas, señalamos dos bacilos, ambos con esporas; el esporangio tiene, aproximadamente, el mismo diámetro que el resto del organismo. Por ello incluímos a nuestros bacilos en el grupo 1).

La posición de la espora es central-terminal, y su forma entre oval a cilíndrica. En las micros números 11 y 12 vemos al bacilo crecido sobre agar nutricio abundantemente esporulado, y la espora ligeramente ovalada. Su membrana fina se aprecia en las micros 8, 9, 15 (M).

El diámetro del bacilo varía según el medio de cultivo y, principalmente, con la vejez: en los cultivos jóvenes suele ser más delgado y lar-

go (micros 18, 19 y 20), pero nunca inferior a 1,5 micras. A medida que envejece, las células se hacen globosas y el diámetro aumenta hasta 3 e incluso 4 micras. En estas mismas micros y en las 34, 35, 36, puede compararse el diámetro de los dos bacilos; el más pequeño mide 0,66 micras.

El protoplasma se hace vacuolado al crecer sobre agar glucosa; pero la vacuolación es más notoria al hacerlo sobre agar-trimetil-amina el 1 por 100. En la micro. 30 todo el protoplasma de los largos bacilos está intensamente vacuolado.

Según lo expuesto, clasificamos los bacilos como Megatherium.

Para esta especie, el Bergey da los siguientes caracteres (82):

Bacillus megatherium De Bary (Vergleichende Morph. u. Biol. d. Pilze, 1884, 499).

Neide, Central blat f. Bakteriologie, 11 Abt. 12-1904-11, da como posibles los siguientes sinónimos:

Bacterium hirtum Henrici, Beitrag zur Bakterien-flora des Kâses Arbeiten aus dem bakterial. Inst. der techn. Hochschule zu Karlsruhe, 1898 Bacterium sessile Klein, Botanische Bakt. Studien, 1 Cent. F. Bakt., 6, 1889, 10; Bacierium brassicae (Pommer) Migula, Ein Beitrag zur Kentniss der fadenbildenden Bakterien, Mitt. d. botan. Inst. Graz., 1886, 1, 95; Bacterium anthracoides (Hueppe und Wood) Migula (see Flügge, Mikroorganismen, 1896, 232); Bacterium pseudoanthracis (Wahrlich) Migula, see Wahrlich, Bacteriol. Studien, Petesburgo, 1890, 91, 26; Bacterium flexile Burchard, Beiträge z. Morph. u. Entwiekel. Gesch. d. Bakt., Inaugural Diss., 1897, Arbeitem aus d. bakt. Inst. d. techen. Hochsh. Karlsruhe, 2, 1898, 11.

Bacilos: 2,5 a 3,0 por 3,5 a 4,0 micras; se presentan aislados, en parejas y en pequeñas cadenas. Móvil con 12 flagelos peritricos. Espora central, 0,75 a 1,25 por 1,5 a 2,0 micras. Gram-positivo. Las células tienen abundante grasa como material de reserva.

Colonias en gelatina: Blanco parduzcas en la superficie de crecimiento. Pequeñas colonias blancas en tubo inclinado.

Colonias en agar: Circulares, densas, color blanco hacia crema, enteras.

Agar inclinado: Blanco sucio, lisas, brillantes, viscosas, siendo el medio parduzco. Cultivos viejos se vuelven amarillentos con manchas sobre la superficie.

Caldo: Turbidez, con crecimiento floculento en la superficie.
Leche tornasolada: No coagulación, peptonización.
Patatas: Densas, blancas, amarillo pálido.
Indol: No forma.
Nitratos: No reduce.
Acido: Con dextrosa, lactosa, sacarosa y glicerina.
Almidón: Es hidrolizado.
Suero sanguíneo: Es licuado en cinco días a 22° C.
Anaerobio facultativo.
Temperatura óptima 35°. Crece hasta 45 a 50° C.
Habitat: Suelo, aguas y materia en putrefacción.

«United States Departament of Agriculture» describe el bacilo del siguiente modo:

El nombre de bacilo Megatherium se debe a Bary, que lo descubre el 1884 en hojas cocidas de col (83); es uno de los miembros más grandes del grupo Bacillus y se presenta en el polvo, suelo, aire, leche y en el agua. El nombre es adecuado por ser la más grande de las bacterias esporuladas. En 1883 Zopf da el nombre de Bacterium Tumescens a un organismo similar, anteponiéndose un año a Bary. Esta referencia generalmente no se tiene en cuenta y en la publicación de Zopf (84) en 1885 se cita como original. Zopf y Bary no dan caracteres precisos para determinar las especies. Desde entonces la descripción del bacilo Megatherium ha sido frecuentemente enmendada y condujo a una definición más clara de la especie que en el caso del Bacterium tumescens. Por esta razón los escritores recomiendan conservar el nombre del B. Megatherium y se descarte el de B. tumescens.

Bacilos vegetativos.

1,2-1,5 por 2,0-4,0 micras, solos o en cadenas cortas, con los extremos redondeados. El protoplasma teñido aparece granuloso o esponjoso; ocasionalmente formas en sombra, móviles; Gram-positivos.

Variaciones: 0,9 a 2,25 por 1,0 a 0,5 micras; filamentos y cadenas largas entrecruzadas; extremos cuadrados; protoplasma teñido uniformemente; muchas formas en sombra, no móviles; yemas laterales y terminales; Gram-variable.

Sobre agar nutricio glucosado: Micros. 7, 8, 9. Bacilos grandes, largos y más vacuolados que en agar nutricio; células irregulares, algunas con los extremos en punta; otras semejantes a sacacorchos; Gram-variable; glóbulos de grasa pequeños y pocos.

Esporangios: No claramente hinchados.

Esporas: 1,0 a 1,2 por 1,5 a 2,0 micras, oval, central o paracentral; algunas se forman en cuarenta y ocho horas. Variaciones: Diámetro, 0,8 a 1,4 micras; forma irregular, reniforme, oviforme, casi esférica o cilíndrica; lateral; no esporula en cuarenta y ocho horas o poco de tres a seis días.

Colonias: Grandes, lisas, blandas, brillantes, redondas, convexas; enteras, blanco cremosas hacia amarillas. Variantes: Rugosas, semejantes al bacilo cereus, con círculos concéntricos; de bordes finos.

Agar nutricio inclinado: Crecimiento abundante, lisas hacia butirosas, opacas, brillantes, ligeramente expansivas, no adherentes, blanco cremosas hacia amarillas; algunas se vuelven pardas con la edad y muestran la envoltura externa punteada. Variantes: Duras, semejantes al bacilo cereus; ligeramente adherentes; la colonia no se difunde. (Véanse micros 19, 11, 12 colonias en placas de agar nutricio y bacilos de las colonias.)

Agar nutricio glucosado inclinado: Crecimiento más abundante y blando que en agar nutricio. Variantes: Gomosas, ordinariamente arrugadas; la cubierta externa más claramente punteada.

Agar glucosa nitrado inclinado: Crecimiento muy duro, elevado. (Micros 13, 14, 15 de colonias y bacilos en este medio, pero en placa Petri.)

Patata: Crecimiento abundante, liso, blando a viscoso, brillante, difundido; blanco cremoso, pálido limón, amarillento o rosado. Variantes: Duras, rugosas o la esporulación es más tardías que en agar nutricio.

Agar tirosina inclinado: Unas pocas cepas forman intenso pigmento negro.

Caldo nutricio: Crecimiento medio abundante y turbidez uniforme, con o sin sedimento abundante, sin película. Variantes: Turbidez floculosa a granulosa delgado y friable, o caldo claro con sedimento floculoso.

Voges-Proskauer: Negativa.

Utilización de citratos: Positiva.

Reducción de nitratos a nitritos: Variable; la mayoría de las cepas positivas.

Prueba de fermentación: Acido sin gas con la arabinosa, fructuoso, glucosa, maltosa, sacarosa, dextrina, inulina, salicilina y manitol; generalmente produce ácido con la xilosa, galactosa, manosa y rafinosa. Acido variable con la lactosa; usualmente no da ácido con la ramnosa.

Hidrólisis del almidón: Positiva (micro. 16).

Máxima temperatura de crecimiento: La mayoría de las cepas crecen entre 40-45 grados. Variantes: Unas pocas dejan de crecer por encima de 48 grados, y algunas crecen a 48.

Hidrólisis del ácido úrico: Variable, no correlativa con otros caracteres; previamente se pensó que podría ser una propiedad que la distinguía del bacilo carotarum; la descomposición del ácido úrico fué también demostrada por ciertas cepas del bacilo Megatherium.

Hidrólisis de la gelatina: Positiva (micro 17).

Cuando hablemos del bacilo B. R. describiremos todas estas pruebas con el medio de cultivo correspondiente.

ECOLOGIA Y MODO DE PRESENTARSE EL BACILO MEGATHERIUM EN LOS EXPERIMENTOS DE TRANSFORMACION DE MOHOS Y LEVADURAS

En nuestras experiencias de trabajo con este bacilo, teniendo en cuenta la ecología de los aislados por nosotros; su pleomorfismo, inmediata consecuencia de las condiciones ambientales; su fácil cultivo y la tendencia a perder los caracteres morfológicos y bioquímicos que le incluyen en la especie Megatherium, adquiriendo los de otra al ser cultivados en un medio especial, nos obliga a considerarle no como una especie bacteriana definida, sino como un nexo, un lazo de unión entre los Eumicetos y los Schizomicetos.

Se aislaron por primera vez de una placa sembrada con esporas de Penicillum notatum número 28 en un medio preparado para la transformación de este moho; en la superficie del cultivo, a los dos días

de incubación a 37º se desarrollan tres colonias de dichos bacilos; las demás eran todas de hongos. Posteriormente, este mismo moho transformado en el medio A. V. da colonias de ME. junto con colonias de B. R. Las microfotografías números 18, 19, 20 muestran tres campos diferentes de la preparación, en los que se distinguen los dos tipos de bacilos. Los B. R., delgados, cortos, agrupados o aislados, pero del mismo tamaño, y los ME., gruesos, de extremos redondos, algunos diplobacilos y formas alargadas rodeadas de pequeños bacilos cuya disposición recuerda a la del micelio del hongo que los ha engendrado. Después, probando el medio Agar B_2 para el mismo moho, obtuvimos un cultivo total de bacilos B. R. (micros números 21 y 22).

La levadura número 6 en un medio a base de hidrolizado de toronja da un cultivo totalmente de levaduras, excepto cinco colonias de bacilos ME. (micros núms. 23 y 24). La misma levadura en nuevos ensayos en medio A. IV se transforma en los dos tipos descritos.

La levadura número 9, al sembrarla en placa de Sabouréaud para aislarla, en una misma colonia se encontraron levaduras típicas con bacilos ME. La colonia se distinguía macroscópicamente de las otras por su brillo especial.

La levadura número 18 en el medio A. IV se transforma en bacilos de los dos tipos. En la microfotografía número 4, en la parte superior izquierda, se ve una levadura típica en gemación, adosado a su pared un bacilo grueso; más abajo un grupo de ellos con dos formas de mayor tamaño e intermedias entre bacilo y levaduras; en este mismo grupo, dos bacilos con tinción menos uniforme, vacuolados, idénticos a los que se ven en la parte superior de la microfotografía. Los bacilos pequeños están a la derecha del campo microscópico.

Del *Aspergillus peniciloides* (T. 20), en el medio Czapek colina conseguimos, después de la resiembra en agar común, bacilos ME. y B. R.

El *Aspergillus Anstelodami* número 79 cultivado en agar común Col. incubado a 27º, sin verificarse la resiembra en el agar, después de un mes de incubación empieza a transformarse en bacilos ME. y B. R.

Desde entonces, en el medio A. IV para las levaduras y el A. V y A. VI para los mohos, el bacilo ME. se presenta frecuentemente con los bacilos B. R. en los primeros momentos de la transformación; es decir, refi-

riéndose a los mohos (que son los que con más frecuencia dan estos bacilos), aparece a las dieciocho horas de la resiembra en agar, después de haber crecido el moho en el medio de transformación el tiempo necesario para que aquélla se realice. Por tanto, las colonias bacterianas resultantes de la transformación de hongos pueden contener: a) los dos tipos de bacilos en la misma colonia o en colonias aisladas; b) el bacilo B. R. exclusivamente —siendo éste el caso más general—, y c) colonias integradas sólo por bacilos Megatherium. Este último caso lo conseguimos únicamente en dos ocasiones: en la resiembra del Penicillium notatum número 28 en un determinado medio de transformación —que al principio lo interpretamos como una contaminación—, y al resembrar la levadura número 6 en un medio a base de hidrolizado de toronja.

Si las colonias bacterianas corresponden al tipo (a), podemos aislar el bacilo Megatherium siempre que lo hagamos dentro de las primeras cuarenta y ocho horas, en las cuales la transformación se realiza; si, por el contrario, dejamos que pase más tiempo, tres o cuatro días, vemos cómo las colonias de Megatherium —si se presentan aisladas de las del bacilo B. R.— van tomando todas las características morfológicas de las de estos últimos, y al hacer una extensión estos bacilos son los únicos que las forman. Así, con frecuencia nos ha pasado que al intentar resembrar en el mismo medio de cultivo las colonias de Megatherium que con las de bacilo B. R. surgieron como consecuencia de la transformación de hongos (levaduras y mohos), y dos días antes de intentar esta resiembra habíamos comprobado al microscopio estaban formadas por estos dos tipos de bacilos, al crecer en el nuevo medio no germinaba ni un solo Megatherium. Según esto, habían bastado cuarenta y ocho horas para que las colonias de este organismo, por no haberlas aislado de los bacilos B. R. en los primeros momentos de la transformación, evolucionaran hasta dar el último. Esta circunstancia nos sucedió muchas veces y lo achacábamos a la génesis de nuestras bacterias —de mohos y levaduras—, pues aun cuando en la clasificación correspondían a la especie Megatherium, podía suceder que no tuviesen la estabilidad propia de una especie típica que como tal especie se había mantenido durante años y años de cultivo. El inconveniente se salvaba al aislarlo en las primeras cuarenta y ocho horas; de este modo el bacilo se conserva en cultivos sucesivos.

Pensando que el bacilo B. R. podía ejercer alguna influencia en el

Megatherium, estimulándole a transformarse o simplemente provocando su muerte y destrucción, sembramos en diferentes medios de cultivo los dos bacilos juntos y vimos cómo crecían sin que hubiera inhibición por ninguno de ellos; en cuaquier momento era fácil aislarlos, conservando cada uno sus características propias. Nuestra sospecha de que el bacilo fuera capaz de inhibir el crecimiento o provocar la lisis del Megatherium no tenía fundamento.

¿Por qué —nos preguntamos— cuando los dos bacilos crecen juntos como inmediata consecuencia de la transformación, para conservar el Megatherium es preciso aislarlo del B. R. en las primeras cuarenta y ocho horas?

¿Por qué si nos retrasamos en hacerlo se transforma en el bacilo B. R.?

No podemos responder a estas preguntas con hechos concretos; la única explicación posible es admitir que el medio de transformación del hongo ejerce aún su influencia metabólica en el primer tubo de donde hacemos la resiembra para conseguir el paso a bacteria, y si queremos evitar la continuidad de su acción sobre dicho bacilo, necesitamos obtener rápidamente nuevas generaciones alejadas del estímulo transformador,

Todos estos datos creemos necesario exponerlos, porque ellos nos indujeron a considerar al Megatherium como un organismo intermedio entre los mohos y las bacterias, y además a intentar su transformación.

MORFOLOGÍA Y TRANSFORMACION DEL BACILO MEGATHERIUM

Una vez aislado el bacilo en agar común, después de sufrir varios pases en el mismo medio, suponiendo que alguna relación filogenética debía tener con los hongos —de donde procedía— y con los bacilos B. R. —a los que se asociaba frecuentemente en las transformaciones—, lo hicimos crecer en los medios de cultivo que habían servido para el paso a bacterias de aquellos hongos y así determinar los efectos que sobre él podían ejercer.

Se sembró en tubos de agar común con vitamina B_{12}, agar colina, A. IV, al mismo tiempo que en Sabouraud, Czapek, agar común y caldo común. En todos ellos, durante las primeras veinticuatro horas se desarrolló con características normales, apareciendo después formas extrañas, considera-

das por algunos autores —oportunamente los citaremos— como variantes. En la micro 25 vemos las colonias del bacilo en Czapek con maltosa al 3 por 100 el tubo de la derecha, y en Saboureaud el de la izquierda; quince días después de sembrados e incubados a 37°, los bacilos cultivados en Czapek que se desarrollan en filamentos largos comienzan a arrollarse según describen Guillespie y Rettger: un bacilo se divide por su mitad y las células hijas quedan unidas por un hilo conectante; las dos mitades se cruzan una sobre la otra —a manera de la letra alfa— y así se forma la primera vuelta de espira (micro 26). Mes y medio después, en el mismo cultivo hemos visto algunas formas ramificadas, bacilos puntiagudos con una yema terminal y una lateral (micro 27, a, b), descritas por Knaysi, y abundantes endosporos. El agotamiento de nutrimentos, según Rettger y Guillespie, son los factores que determinan la esporulación y las formas puntiagudas.

En Saboureaud son frecuentes las células en sombra y globosas en cultivos de quince días (micro 28); pasados dos meses se ven formas redondas pequeñas que parecen corresponder a los microcistos de Knaysi (micro 29). En medio de agar común con trimetilamina al 1 por 100 y glucosa en la misma proporción, da colonias brillantes y mates; las primeras están formadas por bacilos muy largos (micro 30), y los que integran las segundas tienen caracteres normales. Estas células resembradas en medios nuevos vuelven a la forma normal del bacilo.

El cultivo crecido sobre A. IV inclinado merece nuestra atención. Durante las primeras cuarenta y ocho horas se desarrolla normalmente cubriendo toda la superficie del medio; sesenta horas después, en el fondo del tubo, las colonias lisas y brillantes se vuelven rugosas, plegadas exactamente como ocurre con las levaduras al transformarse, y esos repliegues estaban formados por bacilos del tipo B. R. El fenómeno, decimos, es idéntico al descrito en el caso de las levaduras (micro 31).

Nuevos experimentos con los Megatherium números 9, 28 y 6 dieron el mismo resultado. El tiempo preciso para que la transformación se realizara no tiene, como en el caso de las levaduras, un valor fijo. Suele darse el cambio a los dos días, pero a veces tarda ocho.

Insistimos de nuevo que, teniendo en cuenta la filogenia de los bacilos, les suponíamos especialmente aptos para la transformación y ansiábamos repetir la prueba con los procedentes de una colección que no fuera la nuestra y debidamente controlada. El Dr. Gordon tuvo la amabilidad

de enviarnos dos cepas: núms. 234 y 239. Repetimos el experimento y llegamos al mismo punto, pasando por todos los incidentes de las transformaciones anteriores, y siendo también el medio A. IV el único en el que la transformación se realizó. Las micros 32 y 33 pertenecen a los dos tubos en los que tuvo lugar el cambio de las cepas de Megatherium americanas en otra especie bacteriana. El cultivo normal del bacilo se encuentra en la parte superior de uno de los tubos, desde la flecha hacia arriba, o en la parte central del otro; las colonias arrugadas pertenecen ya a la nueva especie, y las que tienen su superficie ligeramente punteada están en el comienzo de la transformación.

De la zona plegada de ambos cultivos se tomó el material para hacer las extensiones correspondientes a las micros 34, 35 y 36, donde aun vemos algún Megatherium, pero con abundantes bacilos pequeños.

Los resultados obtenidos con los bacilos núms. 234 y 235 confirmaban el experimento de transformación, demostrando que el medio de cultivo era tan eficaz para nuestras cepas como para las americanas, y que el cambio de una especie en otra podría admitirse sin reserva alguna.

En la literatura acerca del Megatherium encontramos un trabajo que bien pudiera ser un antecedente del nuestro; su autor es Georges Knaysi, y es él quien por primera vez llama la atención sobre cocos que aparecen frecuentemente en los trabajos con este organismo.

Los resultados que obtiene este investigador en su trabajo le obligan a considerar el hecho como una vulgar contaminación. El autor se expresa así:

«Han extrañado siempre en esta clase de investigaciones los numerosos errores. Los contaminantes en Bacteriología hacen equivocar al investigador por su aparición en múltiples ocasiones. En mis experiencias, los contaminantes más frecuentes son organismos de crecimiento lento, que forman colonias pequeñas, blancas o amarillas, naranjas o rojas. Cuando las placas se desechan pronto, tales organismos pasan inadvertidos, pero trabajos de esta clase dan ocasión para presentarse los contaminantes en muchos caminos imprevistos.»

«Los estafilococos son los más frecuentes, y después siguen los aerobios esporulados. He visto colonias mezcladas y otras indistinguibles de colonias secundarias, que yo considero como contaminantes, porque el fenómeno no pudo repetirse. En todos los casos, el contaminante y la colonia

contaminada fueron aislados en cultivo puro, y se trató de reproducir el fenómeno.»

«Se hicieron también microcultivos y se observó el crecimiento de células individuales, pero en ningún caso he transformado un estafilococo típico y genuino, u otra bacteria desconocida, en bacilo Megatherium, o viceversa.»

Nos parece interesantísima esta observación del Prof. Knaysi, a pesar de ver en el fenómeno una simple contaminación. Nótese que él intenta transformar lo que llama contaminantes en el bacilo Megatherium y el paso contrario, pero «porque el fenómeno no pudo reproducirse» supone una contaminación.

Es curioso el detalle de que los contaminantes sean organismos de crecimiento lento; es decir, el bacilo Megatherium crece normalmente en las primeras horas, y solamente después aparecen los estafilococos y bacilos esporulados aerobios.

El Prof. Socías consiguió la transformación de mohos en formas bacilares o micrococáceas, según el método de siembra. A nosotros, el Aspergillus ruber núm. 75, en un reciente ensayo de transformación en vitamina B_2, nos dió micrococos y bacilos B. R. —micras 37 y 38—; repetido el experimento, sólo conseguimos el bacilo.

Pero hay más: en los ensayos que actualmente estamos haciendo, estudiando la transformación en microcultivos, se observa que a temperaturas elevadas —45°, 48°—, y en microanaerobiosis, el Megatherium puede dar micrococos, y éstos, a su vez, transformarse en bacilos. No nos extendemos en más detalles sobre este punto, porque ha de ser objeto de una próxima publicación.

Todas estas coincidencias entre las investigaciones del Prof. Knaysi y nuestros trabajos nos aferran cada vez más a la creencia de que si este investigador ensayara sus intentos de transformación empleando el medio A. IV, lograría nuestros mismos resultados.

La transformación del Megatherium se consiguió exclusivamente en dicho medio, aunque fué sembrado al mismo tiempo en otros corrientes del laboratorio.

ALGUNOS DETALLES MAS SOBRE LA TRANSFORMACION, CON ESPECIAL REFERENCIA A LA GENESIS DEL BACILO MEGATHERIUM

En el trabajo de Schanderl del año 51, que hemos transcrito casi enteramente, se describe el origen de las bacterias a partir de los hongos, según tres y cuatro maneras, respectivamente, observadas por él en el período de dos y tres meses.

Con nuestra técnica, el paso es muy rápido, y hasta hace poco no nos fué posible seguir todos los incidentes del proceso. Veíamos frecuentemente las levaduras, el micelio de los hongos o las esporas repletas de granulaciones móviles cuando la transformación se acerca; pero nunca hemos podido apreciar esa reunión o desarrollo de gránulos hasta formar bacterias que Schanderl ha visto.

En algunas ocasiones, una vez iniciada la transformación, podemos ver las levaduras o el micelio de los mohos lleno de bacterias iguales, morfológicamente, a las que están fuera de las células fúngicas. Es frecuente observar las levaduras reducidas a la pared externa, rota en un determinado punto, por el que ha salido el contenido interno de la célula; en estas condiciones la levadura recuerda un pequeño saco vacío.

En los mohos, el micelio se deshace, mejor diríamos, se disuelve la pared, dejando en libertad a las bacterias que, ya bien desarrolladas, se albergan en su interior.

En la microfotografía núm. 22 se ve el micelio del Penicillium notatum núm. 28 casi todo él deshecho y algunos bacilos dentro; otros rodean al trozo de hifa que aún está normal, bien teñida y abundantes bacilos por todo el campo. En la micro siguiente, 23, el micelio ligeramente curvado, y en su centro, si nos fijamos, se distingue un grupo de bacilos, y, saliendo de los costados y extremos —a modo de flecos—, cadenas de bacterias.

Por todo lo dicho, admitimos un nuevo modo de generarse los bacilos que Schanderl no ha descrito o no ha visto: En el interior de las levaduras o micelio de los mohos tiene lugar la formación de bacterias móviles con caracteres morfológicos definidos, y para salir de la célula «madre» es preciso que la pared celular se rompa en el caso de las levaduras, o que se disuelva (valga la palabra) si se trata de mohos.

En este proceso nos referimos al tipo de bacteria B. R. Cuando surge el bacilo Megatherium, las cosas no parecen suceder así.

Nunca hemos visto un bacilo de esta especie dentro de una levadura —por su tamaño no cabría— o en el interior del micelio.

La micro núm. 4 muestra una levadura en gemación, bacilos típicos y después un grupo en el que hay dos células entre bacilo y levadura.

Más adelante diremos cómo han sido descritas en el bacilo Megatherium formas llamadas por los investigadores «levaduriformes», originadas cuando la división celular es más rápida que el crecimiento en longitud. Los autores que las describen, al parecer, no han visto que se reprodujeran por gemación; pero nosotros, en adecuadas condiciones, conseguimos por dos veces aislar levaduras de un cultivo puro de bacilos Megatherium, clasificadas ambas como torulopsis colliculosa, aunque proceden de dos cepas distintas: la núm. 6 y la 28. El caso no es nuevo en la historia de la ciencia: en el capítulo sobre el desarrollo de las ideas pleomorfistas y monomorfistas hemos nombrado investigadores que, en circunstancias especiales, aislaron levaduras de los mohos o, mejor, transformaron éstos en levaduras.

Si podemos o pueden generalizarse estas experiencias, y concretamente en nuestro caso del Megatherium, nos veremos obligados a pensar que si en las levaduras se da el fenómeno contrario en cuanto al crecimiento, es decir, es éste más rápido que la reproducción y se verifica ésta por escisión, podrían muy bien adoptar, antes de hacerlo, estas formas intermedias entre levaduras y bacterias —«bacteriformes», si se prefiere— que, sin duda, algún papel desempeñan.

Cuando este bacilo procede de la transformación de mohos, en las primeras horas de cultivo, por su tamaño, por su forma ondulada, por su disposición y su inmovilidad, nos recuerda más a un micelio que a un Schizomiceto (micros 18, 19, 20).

Se ha llevado a cabo la transformación de hongos en microcultivos para poder seguir con el microscopio de fase todos los incidentes del proceso, trabajando del siguiente modo: El moho se siembra primero en tubo inclinado con el medio de transformación preciso e incuba a 27°, como hacemos ordinariamente; al llegar el momento oportuno para la resiembra en el agar —donde debe dar la transformación—, ponemos este medio en un porta excavado y lo sembramos en él, tapando la superficie con el cubreobjetos, que parafinamos en toda su circunferencia para

evitar contaminaciones y la desecación excesiva. El microcultivo así preparado puede mirarse al microscopio de fase, e incluso contar las esporas sembradas antes de incubarlo y, sobre todo, cerciorarse de que el cultivo está puro. El portaobjetos, dentro de una placa Petri, se incuba a 37°.

La transformación conseguida de este modo tiene tres peculiaridades: 1) Se retarda un poco, no apareciendo hasta los cinco, siete o nueve días —a veces tarda más, permitiendo observar más detalles del proceso—; 2) Se engendran primero los bacilos Megatherium —cuando aparecen— y sólo después los bacilos B. R.; 3) En las transformaciones en microcultivos, en el 95 por 100 de los casos, surgen los bacilos Megatherium.

Estas tres circunstancias defienden nuestra teoría por la que consideramos al Megatherium como enlace, en la escala filogenética, entre los hongos y las bacterias.

Es muy probable que en las transformaciones hechas con esta técnica el agente o agentes que estimulan al cambio desarrollen su acción de una manera menos activa, y por ello se retrasa, permitiendo la presencia del Megatherium como fase intermedia, que podría no existir o existir efímeramente en los casos de transformaciones rápidas realizadas dentro de las dieciocho, veinticuatro o cuarenta y ocho horas.

Con absoluta seguridad no podemos precisar cuál es el camino que el hongo ha de seguir para dar este organismo; pero no es aventurado suponer que las granulaciones vistas en las levaduras y mohos, «probacilos» para nosotros y condriosoma según Schanderl, no intervienen ahora para nada. En los microcultivos hechos con este fin, las esporas germinan dando un micelio más o menos largo, ramificado, etc., y algunas de las ramificaciones secundarias, por su morfología, son tan iguales al Megatherium visto en los mismos campos microscópicos que, si imaginamos estas ramificaciones desligadas de la hifa principal del micelio, no nos sería posible distinguirlas del propio bacilo. Es más: por lo observado hasta ahora, probablemente proceda de una ramificación de este tipo desprendida de la hifa principal que es capaz de multiplicarse por escisión, o de una levadura que en sus primeros momentos de la formación del pseudomicelio adquiere la misma aptitud.

Detalles sobre la transformación del Megatherium en bacilo B. R. (subtilis).

Se ha descrito ya el modo de conseguirla y las características macroscópicas del proceso; ahora vamos a estudiar las microscópicas observadas en microcultivos y con el microscopio de fase:

Volvemos, una vez más, a las granulaciones vistas dentro de las levaduras o de los mohos al acercarse la transformación. En el bacilo también se presentan cuando se le hace crecer en el medio A. IV; son muy refringentes y más grandes que las de aquéllos. Si hacemos una extensión de la colonia del bacilo al empezar a transformarse, encontramos numerosas formas ovaladas dentro y fuera del Megatherium; su morfología recuerda a los esporos de esta misma especie, pero son algo más grandes y móviles. Tomando el material con cuidado de la línea señalada en la microfotografía 31, vemos en su mayoría células de este tipo con algún bacilo B. R. predominantes en el fondo del tubo —desde la flecha hacia abajo— o bacilos Megatherium repletos de células ovaladas que al resembrarlas en medio fresco reproducen la nueva especie.

Bacilos Megatherium transformados.

Megatherium	núm.	6	se transforma en bacilo B. R.	núm.	6
"	"	9	"	"	9
"	"	18	"	"	18
"	"	T 20	"	"	T 20
"	"	234	"	"	234
"	"	239	"	"	239

El Megatherium número 79 no hemos podido transformarlo.

ESTUDIO DEL BACILO MEGATHERIUM POR ALGUNOS INVESTIGADORES ACTUALES

La morfología del bacilo Megatherium está tan supeditada a las condiciones del medio ambiente que dió lugar a la creación de nuevas especies cuando no se trataba nada más que de variantes temporales del mismo bacilo.

En 1932 Rettger y Guillespie (85), en un trabajo sobre variación bacteriana, sugiere que la morfología del bacilo varía con el ambiente según el medio empleado y la temperatura de incubación.

Variantes morfológicas y coloniales, así como disociantes, del bacilo las describe Knaysi en 1933 (86). La colonia del Megatherium —según él— tiene un continuado ciclo de desarrollo. Puede suceder que el centro de la colonia sea translúcido u opaco y cuando está plenamente desarrollada presenta zonas concéntricas translúcidas u opacas que alternan. Las primeras corresponden a una depresión de la superficie y contienen principalmente células en sombra, algunas esporas u otras formas. Las zonas opacas están representadas por células normales. Además de estas zonas, pueden presentarse en el desarrollo normal otros círculos más angostos, que Knaysi demuestra experimentalmente ser producto de las variaciones de temperatura. Indica que el material que forma la cepa madre puede ser diferente de las cepas hijas, y más aún, el de estas mismas o el de la primera pueden variar en el transcurso del tiempo, así como su comportamiento. Cita como ejemplo un experimento con el que consigue disociantes del bacilo sin más que variar la concentración de los iones H. en el medio: con un pH de 7,8 fácilmente obtiene una especie de colonia mucoide; si el pH es de 7, este tipo aparece con gran dificultad. Dos meses más tarde, al repetir la experiencia, los resultados son opuestos. Describe diversos procedimientos y las técnicas empleadas para conseguir la disociación del bacilo en cepas: 1) mucoide, 2) de razas enanas, 3) amarilla, 4) gemante, y 5) viscosa. Las cepas mucoides las aísla de cultivos en caldo de carne con un pH = 7,8 o bien a un pH = 7, e incubándolos aeróbicamente, o en un vacío de 25 pulgadas, se puede aislar también de cultivos en caldo de carne con un 0,3 por 100 de cloruro de litio. Cuando se inicia el crecimiento secundario suelen presentarse pequeñas colonias que constituyen la variante de razas enanas. Ocasionalmente en estas variantes aparecen sectores amarillentos. Algunos cultivos viejos pueden dar también cepas amarillentas, pero estas variantes, declara, no son estables y al resembrarlas en medio nuevo reproducen la colonia madre blanca. Solamente la cepa variante amarilla estable se obtiene en un medio con ricinoleato sódico. La cepa gemante se consigue de cultivos en caldo de carne neutro o alcalino y de la última variante. Del caldo de carne alcalino se puede aislar la cepa viscosa, y de esta cepa ge-

mante, semejante a la ya mencionada, pero con la particularidad de reducir los nitratos a nitritos; propiedad de la que participa la variante propiamente dicha, pero que no presenta la cepa gemante que se nombró en primer lugar.

De la estabilidad de las variantes el autor dice: «Pero todas las variantes son muy estables, en el sentido de que una cepa puede siempre recuperarse, aunque muchas de ellas se disociarían en otras formas. Placas de Petri conteniendo cultivos en agar infusión de caldo de carne, se resembraron en julio en placas y se conservaron en el laboratorio hasta febrero del año siguiente. Estas placas no se secaron, y de varias colonias se recuperaron idénticas cepas. En vista de este resultado es raro compartir la opinión de que hay sólo una o dos formas estables de cada organismo» (Hadely, 1927) (87).

Describe luego formas no corrientes del B. Megatherium que se ven en las colonias variantes obtenidas, aunque cada una de las colonias disociantes se caracteriza por el predominio de un cierto tipo celular. Estudia luego las yemas laterales y terminales, las artrosporas y microcistos, las formas en círculo y raqueta y las ramificadas.

Las variantes no esporuladas las considera disociantes estables hasta el año 1935 (88) que, refiriéndose a esta comunicación, se expresa así:

«En una previa comunicación sobre la variación del bacilo Megatherium (Knaysi, 1933), el autor cita:

Muchas de las variantes no son esporógenas y vemos que la formación de esporos es una de las características que más pronto pierde el B. Megatherium. Además, una vez perdida la facultad de formar esporas, parece que no hay tendencia a recuperarla. Varias cepas así cambiadas se han investigado durante un año aproximadamente en la formación de esporos, pero no se ha visto ninguno. Colonias de seis y siete meses, viables todavía, estaban libres de esporas. Desde que se ha escrito esto, el autor tuvo que ausentarse varios meses. Durante este tiempo los cultivos de las diversas variantes se conservaron en cámara fría cuya temperatura fluctuaba alrededor de 0° C.»

«Se hicieron incubaciones en agar infusión de caldo de carne de pH = 7. Las resiembras se incubaron durante veinticuatro horas a temperatura ambiente y luego se colocaron en el cuarto frío. Once meses más tarde los cultivos se sembraron en placas de agar caldo de carne y se hicieron las observaciones siguientes: todos los cultivos eran viables, ex-

cepto la cepa gemante. Las formas resembradas se habían disociado algo en otras formas, pero las originales se hallaban todavía en abundancia y se recuperaban fácilmente.»

«Examinado para ver esporas, se halló que la variante mucoide, la amarilla y la de razas pequeñas formaban profusa y rápidamente esporas. Las colonias eran idénticas a las no esporuladas previamente descritas y de las cuales las presentes se originaban. Las células de las cepas esporuladas han asumido citológicamente ciertas características de las células del Megatherium típico, per ejemplo, la presencia de los gránulos apreciables a lo largo de las células antes de que tenga lugar la esporulación. El tamaño y la forma de las células se ha asemejado también a las células ordinarias del organismo.»

«No es cierto que las células mucoides por sí mismas hayan recuperado la facultad de formar esporas o que las formas pequeñas, muy abundantes en las colonias mucoides, sean responsables de la presencia de esporas.»

«Es éste el primer caso de un organismo esporulado que recupere la facultad de formar esporas después de haberla perdido. La condición asporógena de estas variantes se ha confirmado repetidamente por exámenes frecuentes al microscopio y calentando suspensiones de agar caldo inclinado y en placa Petri.»

Olga A. Smith y colaboradores (89) estudian los efectos producidos por la concentración de iones hidrógeno y de las soluciones de sal en cinco variantes del bacilo Megatherium, llegando a la conclusión de que los cambios no son permanentes, pero sí fueron respuesta a las condiciones del medio ambiente y más apreciables cuando el medio de cultivo contenía agar. Los autores se expresan así: 3) cuando el contenido en sal aumenta, la colonia cambia el color de crema a crema oscuro, a col. pardas rojizas y, finalmente, a amarillas; 4) el 1 por 100 de sal en el medio da colonias rugosas y largas células delgadas. Colonias lisas y pequeñas células fueron características de medios faltos de sal y de los que contenían un porcentaje de sal mayor del 1 por 100. Cuando aumenta la sal por encima del 1 por 100, aumenta la tersura de la colonia y disminuye notablemente la longitud de las células, llegando a ser propiamente «cocoides» (diplococos y tétradas), con un 8 por 100 de sal; 5) estas formas cocoides surgen por dos caminos: por

división transversa de las largas células ordinarias y por formación de diversos cuerpos cocoides dentro de las largas células; 6) la formación de esporas era más rápida con un 2 por 100 de sal; a medida que la concentración de sal aumenta, la esporulación se hace más lenta.

En 1933 Stanhope Bayne-Jones y A. Petrilli (90) estudian la formación de endosporos y factores que influyen en su formación, en microcultivos del bacilo. Conceden más importancia al factor O_2 que al agotamiento del medio como factor estimulante de la esporulución, y señalan que ya Wund (91) (1906) demuestra que la formación de esporas no se realizaba ni en un medio adecuado si la proporción de O_2 en la atmósfera del tubo de cultivo estaba por debajo de un 13 por 100. Es probable —dicen los autores— que un exceso de humedad inhiba o retarde su formación. En un medio a base de agar al 2 por 100 y Cl a 0,5 por 100 con un pH = 6, 8-7, 4, no tiene lugar la formación de esporos; pero en el mismo medio, disminuyendo la proporción de peptona, el bacilo esporula. Según los autores, «el efecto de la reducción de peptona es acortar el período de la multiplicación vegetativa de tal forma que las bacterias alcanzaban la edad apropiada para formar esporos en un tiempo en que las condiciones del medio aún eran favorables para su formación. El crecimiento casi alcanzaba su fin a las dieciséis-diecinueve horas, aunque algunas bacterias que no producían esporos continuaban aumentando veintiuna horas después de sembradas. Creemos que el retraso del crecimiento en medio agar peptona 0,5 por 100 de las bacterias en cultivo se origina antes de que todo el O_2 utilizable sea empleado, o que la difusión del O_2 guardaría relación con el crecimiento poco abundante, permitiendo el sostenimiento de una tensión de oxígeno adecuada para la formación de esporos».

De todos modos, estos resultados no prueban que éstas sean las condiciones perfectas para la formación de esporos —dicen al final del trabajo—; no se realizaron las medidas cuantitativas de cada factor por separado y sin duda existen otras influencias más complejas.

Leo F. Rettger y Hazel B. Gillespie (92) (1933) demuestran la existencia de una membrana celular definitiva en el bacilo Megatherium y hacen algunas observaciones sobre su pleomorfismo, achacándolo principalmente al medio empleado, a la temperatura y al tiempo de incubación.

Los mismos autores (93) en 1935 continúan este estudio empleando microcultivos y el microscopio de fase.

Los microcultivos los hacen en pequeños bloques de agar de un centímetro cuadrado de superficie por 0,5 cm. de grosor, y son sembrados por la cara superior e inferior del bloque para determinar la influencia que ejerce la densidad del crecimiento como factor estimulante de la variación bacteriana. Observan la tendencia de las células en cuña a presentar los extremos puntiagudos, y como el alargamiento de los mazos de las llamadas células en maza está en relación inversa con la densidad del crecimiento de la superficie inferior del bloque de cultivo. Cuando este crecimiento se hace muy denso, la variación no aparece, y ésta es el resultado del equilibrio entre los factores desfavorables del medio ambiente y aquellos que favorecen el crecimiento.

Probablemente —dicen los autores— la variación es una consecuencia de la adaptación del organismo a las variaciones del ambiente que le rodea.

La formación de las variantes se presenta en una serie sucesiva: bacilos normales, luego formas cocoides y globosas seguidas de células mazudas y afiladas, filamentos largos y finos, filamentos ramificados y, finalmente, filamentos arrollados. A pesar de esta afirmación, los autores no admiten un ciclo vital, porque cada una de estas formas no se engendra de la inmediata anterior, sino de la forma normal del bacilo. Estas variantes, al resembrarlas en medio fresco, vuelven al *Megatherium* típico, y esta serie sucesiva obedece a los progresivos cambios del ambiente.

Cuando el O_2 se va agotando en el medio de cultivo, o el crecimiento asociado del bacilo es excesivo, adopta formas cocoides grandes y globosas muy resistentes a los factores desfavorables, pudiendo permanecer viables cuando los bacilos normales perecen a consecuencia del ambiente desfavorable.

Estas células en medio nuevo se alargan a partir de un punto que crece más rápidamente que la masa celular restante hasta dar el bacilo normal. Como con tensión reducida de O_2 el bacilo no esporula (Bayne-Jones y Petrilli, 1933) (90), estas formas, por sus características, pueden desempeñar el papel de conservar la especie, supliendo de este modo la función desarrollada por la espora. En un cultivo envejecido, pobre en O_2, cuando se le coloca sobre el agar un pequeño cristal de K Mn O_4 en una

gota de agua, el cultivo que había dejado de crecer lo hace de nuevo con apariencia normal en la zona ligeramente coloreada por la solución de permanganato potásico; en las proximidades de ésta, pero sin ningún color de la sal, se ven células punteadas, en maza, etc., y en las más alejadas, donde no se hace sensible su efecto, el crecimiento sigue inhibido. De aquí deducen que el K Mn O_4 puede actuar por el O_2 que desprende o por algún factor o producto metabólico que estimula la viabilidad y en bajas concentraciones la destrucción sólo es parcial.

Han visto que todas las variantes morfológicas no se encuentran uniformemente distribuídas en colonias, sino en áreas circunscritas definidas: en estratos horizontales se localizan las formas cocoides y globosas; ramificadas y mazas puntiagudas en áreas periféricas. La formación de racimos o agrupación de grandes cocos, cuando la tensión de O_2 es baja.

Las formas cocoides y de levaduras vistas con frecuencia en los cultivos viejos, cuando el O_2 escasea, resultan de una repetida escisión binaria de bacilos cuyo crecimiento en longitud se ha retardado. Esta opinión es sostenida también por Wyckoff en 1933 (94, 95) y en 1934 en un nuevo trabajo, y también por Lewis en el 32 (96); ambos aseguran haberlo visto en otras especies bacterianas.

Yemas, conidios o gonidios se observan en los cultivos viejos, pero no se forman por gemación, sino por división del extremo de la célula; son capaces de reproducir bacilos normales en cuanto a su forma, pero no se ha visto que tales bacilos se reprodujeran.

Describieron otro tipo que es capaz de trasladar la colonia a nuevos ambientes favorables cuando se hace inadecuado para las células.

Son bacilos que crecen en longitud hasta alejarse de la colonia madre y alcanzar el punto deseado, en donde luego se dividen dando otra colonia hija. En el mismo año, y en otra publicación, aseguran que la variación sólo es posible cuando se equilibran las condiciones favorables y desfavorables (97).

En 1939 (98) abordan el problema desde los siguientes puntos de vista: 1) aparición y desarrollo de las llamadas células normales en un medio ambiente favorable; 2) modo y formación de las células variantes; 3) destino de estas células en el ambiente en que surgen; 4) principales condiciones para su producción, y 5) su comportamiento al ser transferidas a nuevos medios. En los cultivos jóvenes —dicen los autores— el bacilo *Megatherium* presenta tres tipos celulares: bastones norma-

les, filamentos largos y «formas de extremos redondeados». Las mismas células se pueden ver en cultivos viejos, en la periferia de las colonias cuando están bien aisladas, en donde las condiciones ambientales siguen siendo buenas. Según parece, la relativa favorabilidad del medio influye más en el crecimiento celular que en la reproducción; por este motivo las formas alargadas se presentan en los cultivos jóvenes.

Los largos filamentos pueden curvarse, y al dividirse en dos células hijas lo hacen en tal forma que éstas quedan unidas por un fuerte hilo protoplasmático interpretado como un plasmodesmo. La más larga de las células se va aproximando a la otra hasta formar un cierto ángulo y se arrolla en torno a ella, dando lugar a un cordón retorcido; dos o tres pares de estos filamentos pueden unirse y formar una cuerda más gruesa. formas similares las describió Joy en 1928 (99), y Miessner, en el 31, da a conocer un trabajo con una microfotografía de células entrelazadas pertenecientes a un cultivo de Clostridium novyi (100).

En un principio, el arrollamiento sugiere a Guillespie y Rettger la idea de una posible conjugación celular, pero su formación y destino —se segmentan al envejecer según el modo usual— les hace suponer luego que es el resultado de ciertos factores mecánicos o físicos más que de ciertas afinidades fisiológicas entre las células.

Cuando el crecimiento o la reproducción cesa, tiene lugar la esporulación o la formación de células variantes o ambas cosas a la vez.

Las células ramificadas son propias de cultivos viejos; en la periferia de las colonias se ven células con un extremo ensanchado en el que se forman dos protuberancias que al crecer dan las ramificaciones.

Son frecuentes las células en forma de huso, que según Künhn y Sternberg (101) se deben a que las esporas de un protozoo parásito penetran en el cultivo bacteriano y en las células bacterianas se desarrollan. Los autores advierten que no han visto ningún protozoo en sus cultivos. Una vez más insisten en que organismos de formas no corrientes no son capaces de producir células del mismo tipo, y que una forma de variante celular no se desarrolla en otra forma de variante celular. En el ambiente responsable de su formación, tales células aumentan simplemente de tamaño y quedan aletargadas hasta que sobreviene la autolisis y mueren.

Como factores estimulantes de la variación destacan el crecimiento superpoblado, pudiendo influir de seis maneras diferentes:

1) La superpoblación puede favorecer la formación de grandes me-

tabolitos tóxicos, y la acumulación de tales substancias incitar al pleomorfismo.

2) Causar el agotamiento de materiales alimenticios esenciales, y la falta de nutrimentos inducir a la variación morfológica.

3) La carencia de nutrimentos puede ir acompañada de deficiencias de O_2, y la poca tensión de este gas ser la responsable de la formación de células variantes.

4) Alterar los fenómenos óxido-reductores del medio, y el potencial inadecuado resultante originar los tipos variantes.

5) Puede apresurar la maduración de las células en el cultivo, y las fases pleomórficas de un ciclo reproductivo aparecer más rápidamente bajo tales circunstancias de lo que se presentarían en un ambiente menos poblado.

6) Pueden influir una combinación de todos estos factores.

Realizan diversos ensayos para determinar la influencia de los metabolitos no gaseosos y llegan a la conclusión de que solamente la superpoblación y la falta de nutrimentos actúan. Nuevos experimentos realizados de tal modo que ni la ausencia de los nutrimentos ni los metabolitos gaseosos influyan, pero sí la escasez de O_2, conducen a la aparición de variantes.

Sólo dos tipos celulares parecen estar relacionados con la carencia de nutrimentos, según la comunicación hecha por estos mismos autores en 1937 (102): la formación de esporas y la de bacilos puntiagudos. Dentro de ciertos límites, decreciendo el nutrimento, aumenta la proporción de estas formas. De todos modos, cada tipo celular se encuentra en mayor o menos número en todos los medios estudiados.

En el resumen y conclusiones de este trabajo dicen que los intentos de conseguir otros tipos de variación, regulando la tensión de O_2 en el medio de cultivo, han sido infructuosos. Los gránulos que ellos han observado frecuentemente en los cultivos no han sido capaces de producirse; por ello no los consideraron como viables.

Los trabajos más recientes con este bacilo versan principalmente sobre la hemolisina que produce, estudiada ya por Todd en 1901 y por Warden, Connell y Holly, quienes en 1921 determinan su actividad frente a los hematíes del hombre, cobaya y mono, así como la influencia favorable del O_2 en su producción (103). Acerca de su morfología insisten de nuevo

Dubin y Sharp (104) en 1944, realizando sus estudios con el microscopio electrónico. Welshiemer y Robinson (105) investigan sobre la lisis del bacilo, sometiéndolo antes a la acción del formaldehido para inactivar las enzimas autolíticas, llegando a la conclusión de que la lisis mediante la lisozima depende de la temperatura y de la acción del metanol sobre las enzimas.

La germinación de la endospora y la estructura de su membrana fué investigada por Knaysi y Hillier en el mismo año (106). Grelet (107) elabora un medio glucosado sintético para cultivo del bacilo, observando que la falta de Zn con deficiencia de Ca^{++} favorece la esporulación.

Lwoff y Gutmann (108) estudian una cepa lisógena de este bacilo; describen cómo puede perpetuarse la capacidad de producir bacteriófago en ausencia del fago libre en el medio, y aseguran los autores que esta propiedad se transmite por vía endomicrobiana.

Clarke, en el presente año (109), demuestra que una cepa lisógena de bacilo Megatherium cultivada en un medio sintético desprovisto de calcio (Ca^{++}), pierde su capacidad de lisis. El mismo bacilo sirve a Clarke y Cowles (110) para determinar la relación bacteriófago-bacteria en cultivos que crecen en caldo extracto de levadura con tripsina.

De la lisis del bacilo se ocupa también Welshiemer en 1951 (111), observando que al fenómeno le favorece la anaerobiosis.

Delamater y Hunter, en dos trabajos sucesivos (112, 113), describen la actividad nuclear que tiene lugar durante la esporulación del Megatherium.

DISCUSION

La literatura expuesta es suficiente para darnos cuenta de lo que ha preocupado y preocupa el pleomorfismo tan variado de este bacilo, y cómo algunos autores describen variantes morfológicas y disociantes que no sabemos hasta qué punto deben considerarse como tales. Las variantes no esporuladas fueron para Knaysi, en el año 1933, disociantes estables; dos años después, en un nuevo trabajo, reconoce la facultad de formar esporas a estas mismas cepas. Los demás trabajos citados son incompletos y muy confusos; Rettger y Guillespie hacen, en el 39, un estudio más detallado, llegando a la conclusión de que tales variantes son debidas a las condiciones ambientales.

Nosotros, como los dos últimos autores, hemos visto todas las formas extrañas, citadas por ellos, en un mismo medio de cultivo y en una misma colonia a medida que envejecía. No debe hablarse, pues, de «disociantes», ni de «variantes», ni tampoco de un ciclo vital, cuando toda esta morfología es el resultado de un ambiente desfavorable y respuesta defensiva de un organismo extremadamente pleomórfico y sensible, que se resiste a morir.

El trabajo que nosotros presentamos, respecto a este bacilo, es la transformación de una especie bacteriana en otra que se mantiene con las nuevas características en cultivos sucesivos y su relación filogenética con los hongos; así, pues, nos vemos obligados a admitir una «variación, transformación» duradera y estable —«o como se le quiera llamar»— o la fase de un ciclo evolutivo hasta ahora desconocido.

CLASIFICACION DE LOS BACILOS B. R.

Las 42 cepas de bacilos B. R. son todas esporuladas y con el esporangio no claramente hinchado; siguiendo la norma de clasificación incluída en la página 35, pertenecen todos estos bacilos a la especie Subtilis.

Los medios de cultivo preparados son los siguientes:

Agar glucosado:

Agar caldo de carne con glucosa al 1 por 100. En las micros 39 y 40, el bacilo se desarrolla sobre este medio.

Agar glicerinado:

Lo mismo que el anterior, pero sustituyendo la glucosa por glicerina en igual proporción.

Medio para la prueba de Vogues-Proskauer:

Descrito en la página 37.

Para la hidrólisis de la gelatina:

Se intentó preparar modificando la técnica de Frazier (114), con arreglo a la empleada por U. S. Department of Agriculture, según el medio que damos a conocer.

Extracto de carne...	3 grs.
Peptona	5 »
Agua...	1.000 »
Agar	c. s.
Gelatina	0,4 %

El medio elaborado con arreglo a esta norma no nos dió la hidrólisis del B. subtilis empleado como control en nuestras pruebas; fué preciso aumentar la proporción de gelatina hasta un 1 por 100. El medio así modificado «se pone sobre placas Petri; se siembran los bacilos y se incuban a 28° C. durante dos a catorce días, según la tasa de crecimiento; las placas se cubren con 8 a 10 c. c. de la siguiente solución»:

Agua destilada	100 c. c.
H Cl concentrado	20 »
$Hg\ Cl_2$	15 grs.

«Este reactivo forma un precipitado blanco con la gelatina, que no ha variado, y deja una zona clara, donde aquélla se ha hidrolizado.»

«La tendencia de algunos cultivos a propagarse se evitó desecando las placas a 28° C. en la estufa, durante cuatro o seis días antes de la siembra. Este método es preferido al de puntura en gelatina, porque la temperatura de incubación no necesita ser baja, y aun las cepas débiles dieron la hidrólisis». En la micro 41 se distingue el halo de transparencia en torno a las colonias de uno de nuestros bacilos B. R. como prueba definitiva de la hidrólisis; en la 42, un bacilo coagulans que no la hidroliza.

La hidrólisis del almidón, para verla, fué preciso introducir una modificación en la técnica de Kellerman y McBeth (115). Se prepara el agar nutricio con la mitad del agua que indica la fórmula:

Extracto de carne	3 grs.
Peptona...	5 »
Agua	1.000 c. c.
Agar	c. s.

y a la otra mitad se le ha de agregar la fécula de patata, que se pondrá a bañomaría durante una hora y a 100° C, con el fin de conseguir una

solución coloidal; se mezcla con el agar nutricio previamente preparado y se lleva al autoclave. La fécula de patata se añade en la proporción de 1 por 100. Luego, según el método de Kellerman, «se pone en la estufa a 28° C. durante uno u ocho días, según el desarrollo del cultivo, y se inundan las placas con alcohol al 95 por 100; si el almidón permanece invariable, el medio resulta blanco y opaco; pero si éste es hidrolizado, aparecerá una zona translúcida alrededor o debajo del cultivo.» Con esta modificación conseguimos un buen medio, en el que la hidrólisis puede ponerse de manifiesto a los cuatro o cinco días de haber sido incubados los cultivos a 27° C. Micro núm. 43, con hidrólisis positiva de uno de nuestros cultivos de bacilo B. R., y en la núm. 44, colonias de bacilo pumilos, que no hidrolizan al polisacárido.

Reducción de nitratos a nitritos (116):

«La prueba se realizó con cultivos que crecen en caldo común con KNO_3 al 1 por 100, de tres a cinco días.»

«Para cada 5 c. c. del cultivo se añade 0,5 c. c. de una solución al 1 por 100 de fécula de patata, 0,5 c. c. de una solución al 0,4 por 100 de K I y, después de mezclado, una gota de H_2SO_4 concentrado. Si hay nitritos, se forma una coloración azul. Y si hay muchos nitritos, resulta un precipitado espeso con desprendimiento de gas.»

Agar glucosado nitrato.

K_2HPO_4	1 gr.
$Na\ NO_3$	1 »
Glucosa	10 »
Agua	1.000 c. c.
Agar	c. s.

Los bacilos crecidos en este medio los vemos en las micros 45 y 46.

Bacillus subtilis.

Sobre la identidad de este organismo hubo y hay gran confusión, por su inadecuada descripción y la distribución de cultivos impropiamente clasificados como bacilo subtilis.

Ehrenberg lo aísla por primera vez de una infusión de heno, y en 1838 le llama Vibrio subtilis; Cohn, en 1875 (117), le denomina b. subtilis. Ninguna de las dos descripciones fueron sufi-

cientes para diferenciar este organismo de otros parecidos a él, y en 1903 Chester (118) afirma que el bacilo subtilis y el vulgatus de Trevisan (119) son el mismo, porque los caracteres sobre los que se basa su separación eran demasiado variables. Lawrence y Ford, en 1910 (120), creen que las dos especies pueden ser separadas «por cuidadosas observaciones de las reacciones de los cultivos y particularmente en caldo y en patata». El bacilo descrito por los investigadores alemanes tiene tres o cuatro micras de largo por una de grueso, forma hebras y es activamente móvil; en el agar da colonias antracoides; en el caldo origina una membrana superficial gruesa, arrugada; licúa el suero sanguíneo, y las colonias sobre patata son blanco-amarillentas a crema.

En 1930, Cohn (121) cree que hay dos tipos de bacilos subtilis: el tipo Marburg, con esporas pequeñas, de germinación ecuatorial, y el Michigan, con esporas mayores, de germinación polar. Asegura que la primera cepa es la genuina, y su opinión la acepta el II Congreso Microbiológico Internacional (122). En 1932, Soule (123) afirma que el típico es el representado por la cepa Michigan.

Gordon, Smith y Clark (124) separan el bacilo subtilis del aterrimus y niger —estos dos ya claramente diferenciados en el 39 por Clark y Smith—, por la propiedad que tienen los dos últimos de formar un pigmento negro al crecer sobre medios con carbohidrato o tirosina, respectivamente.

Lamanna, en 1940-42 (126, 127), se basa para su distinción en pruebas serológicas y en la germinación de la espora, con o sin ruptura del eje transverso. Divide el cultivo de las dos especies en un grupo de cuatro y en otro de doce. Como cultivo típico de subtilis escoge uno de los que le envía Ford, y con el bacilo vulgatus coloca otro de los cultivos de Ford, dos subtilis de la cepa Marburg y algunos auténticos de subtilis. En 1940 (128), por serología, comprueba que la cepa Marburg de subtilis es un bacilo vulgatus. En el 44, Knaysi y Gunsalus, así como otros investigadores, no están de acuerdo con la decisión del International Committee on Bacteriological Nomenclature (129).

Las características dadas por el Bergey son las que siguen:

Bacillus subtilis: Antiguo Conhn. Pragmowski. (Cohn, «Beiträge z. Biol. d. Pflanzen», I, Heft 2, 1872, 175; Heft 3, 1875, 188; 2, Heft 2. 1876, 249; Pragmowski, «Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte

u. Fermentwirkung einigen Bakterien -Artem.» Inaugs Diss., Leipzig, 1880). Del latín subtilis, sutil, delicado, pequeño.

Prototipo: Vibrio subtilis Ehrenberg, «Infusionsthierchen als vollkomene Organisme», Leipzig, 1838.

Los datos siguientes se basan en la revisión de H. 3. Cohn sobre la descripción de la especie Marburg («Sour. Ing. Dis.», 46, 1930, 341).

Esporos: Ovoide, de paredes finas o sin ellas en el momento de la germinación; 0,6 a 0,8 micras. Germinación ecuatorial.

Esporangios: De ovalados a cilíndricos, no en cadenas. Los restos de esporangios desaparecen rápidamente.

Bacilos: 0,8 por 1,5 micras, presentándose solos o en parejas; algunas veces, en cadenas cortas. Móviles, con flagelos perítricos. Células con abundante glicógeno. Gram-positivos.

Colonias en gelatina: Circulares perfectas, blanquecinas, licuefacción.

Puntura en gelatina: Superficie de crecimiento blanquecina. Liquefacción crateriforme, en forma de saco o estratiforme.

Colonias en agar: Pequeñas, parduzcas, formas circulares ameboides, extremos dentados.

Agar inclinado: Crecimiento fino, esparcido, blanco grisáceo; a menudo adherido al medio.

Caldo: Turbio, llega a aclararse con superficie de crecimiento coherente.

Patata: Crecimiento muy abundante, verruguso, gris, llegando a ser rosado, con vesículas en la superficie. Después puede ponerse seco y harinoso.

Leche: Sin coagular, se vuelve alcalina, lentamente peptonizada.

Suero sanguíneo: Crecimiento extendido, blanquecino con un matiz rosado, lentamente licuado.

Agar-glicerina: Una zona rosa bajo la superficie de crecimiento.

No forma indol.

Produce nitritos a partir de nitratos.

Hidroliza el almidón.

Ligera producción H_2S.

Produce ácido a partir de la dextrosa, sacarosa, xilosa, arabinosa,

glicerina, dextrina, inulina y salicina. No produce ácido a partir de manitol, dulcitol, galactosa, manosa, lactosa o ramnosa.

Produce álcali a partir de asparagina; ninguno a partir de peptona.

Produce acetilmetilcarbinol.

Temperatura óptima, 30 a 37° C. Límites de crecimiento, 10 a 56° C. Los esporos sobreviven a la 1,25 horas de permanecer a vapor fluente, y hasta las 19 libras en autoclave.

Facultad aerobia.

O r i g e n: Primeramente se aisló (1872) a partir de una infusión de lentejas; después (1875), de una infusión hervida de queso y remolacha blanca; más tarde (1876), de una infusión hervida de heno. Por eso se llama frecuentemente el bacilo de heno. Forma de germinación de esporos, primeramente establecida por Prazmowski (loc. cit.).

H a b i t a t: Distribuído ampliamente en el suelo y en la descomposición de materia orgánica.

En resumen: aunque oficialmente se acepta la cepa Marburg como genuina, es hoy el día que no puede decirse cuál es el bacilo s u b t i l i s, y el resultado final de nuestro trabajo complica cada vez más la identidad de este bacilo, cuya ecología es tan sorprendente.

En una de sus comunicaciones, el Prof. Socías dice unas palabras sobre esta bacteria, que hacemos nuestras y transcribimos:

«Téngase presente que el hongo que nosotros estudiamos es un A s p., y que la mayoría de las especies de este género son de las más frecuentes en el suelo. Otro tanto ocurre con la bacteria que surge de la transformación; es tan frecuente, que suele ser una de las que más comúnmente se encuentra como contaminante de los medios de cultivo. Esto último ha sido causa de que durante meses hayamos considerado o temido que se tratase de una contaminación, y no de una transformación. Recuérdese que este bacilo es el llamado durante muchos años «bacilo del heno». A continuación veremos la abundancia de poliurónidos en la Naturaleza, en especial en los espacios intercelulares de las plantas; de manera que no sería nada de extrañar que en la Naturaleza se diese con gran frecuencia la transformación que hemos descrito, y ésta sería la causa de la presencia de tal especie bacteriana en las plantas, como el heno, una vez muertas y en mayor o menor alteración.»

Discusión.

Nosotros esperábamos conseguir de cada levadura transformada, de cada moho, especies bacterianas distintas y siempre la misma para cada especie de moho o de levadura; o sea que esperábamos en hipótesis, por ejemplo, obtener de un Asp. niger un bacilo subtilis; un Pn. notatum se transformará en un céreus, un sacharomices podía hacerlo en un bacilo acético, etc. La realidad es otra, y, pese a nuestro esfuerzo, nos encontramos siempre con el mismo tipo de bacilo.

Podría explicarse esta persistencia suponiendo que el factor de transformación permitiera solamente la generación del subtilis; otros factores, desconocidos para nosotros, serían capaces de engendrar nuevas bacterias. De ser así, la propia actividad del hongo es la que desempeña el papel fundamental en la transformación; hemos visto que dos transformaciones espontáneas de levaduras se realizaron en Saboureaud y en Löwenstein y Saboureaud, con dos únicas circunstancias comunes: la relativa anaerobiosis del cultivo, debido al tapón de goma, y el factor tiempo. Fué luego la célula capaz de lograr una síntesis metabólica, nuevos fermentos —si se prefiere— o —como diría Enderlein (71)— una variación genética en la valencia del núcleo, hasta adquirir la propia del bacilo subtilis, pasando ya a la fase Schyzomyceto del ciclo evolutivo que él describe y dice haber observado entre los Aspergillus niger, fumigatus, flavus y el bacilo de Koch. Sin embargo, no debemos olvidar que Schanderl aísla de sus transformaciones un esporulado morfológicamente semejante al nuestro, y en todos sus trabajos consigue el mismo, aunque no lo ha clasificado. Nos propusimos más de una vez lograr otras especies, empleando procedimientos que no describimos porque nada nuevo nos han enseñado; con ello, el problema sigue en pie: ¿Son, efectivamente, estos bacilos la misma especie bacteriana definida? ¿Son especies diferentes, que la clasificación actual no distingue?

Resumiendo, creemos firmemente que este bacilo se obtendrá en todas las transformaciones cuyos factores de transformación sean del tipo de los que hasta ahora empleamos, cualquiera que fuere la especie de origen, y, en consecuencia, hay que buscar nuevos factores y hacer un detallado estudio del subtilis.

Como corolario surge la necesidad de una renovación de las clasifi-

caciones bacteriológicas que se fundamenten más en la filogenia de las bacterias, y esto será posible cuando tal filogenia nos sea conocida; consideramos también que el camino del pleomorfismo es el único que puede aportar este conocimiento.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) Clasificamos 42 cepas de bacilos resultantes de la transformación de mohos y levaduras; describimos su ecología.

2) Modificamos tres técnicas empleadas en la clasificación.

3) Transformamos siete cepas de bacilos Megatherium y estudiamos su morfología.

4) Describimos el modo de realizarse la transformación con datos observados en microcultivos y en el microscopio de fase.

5) Señalamos un posible antecedente de transformación del bacilo en uno de los trabajos del Prof. Knaysi, aunque no lo interpretó como nosotros.

6) Hacemos un breve resumen de los estudios morfológicos realizados por investigadores actuales.

7) Llegamos a la conclusión de que el Megatherium no debe considerarse como una especie bacteriana, sino como una fase intermedia entre los mohos y las bacterias, y defendemos la existencia de un ciclo vital que une a estos organismos, cuya fase intermedia es este bacilo.

RESUMEN GENERAL

1) En diferentes medios de cultivos especiales, cuya elaboración se da a conocer, hemos conseguido la transformación de 11 levaduras en bacterias, de 13 ensayadas.

2) Describimos los detalles fundamentales del proceso.

3) Exponemos las razones que nos obligan a admitir como factores estimulantes el gas SH_2, en su papel óxido-reductor, u otras substancias con propiedades similares; el envejecimiento del cultivo y la humedad del medio.

4) Comparamos nuestro trabajo con el de otros investigadores y señalamos las características fundamentales que distinguen al nuestro.

5) Destacamos la génesis de las bacterias en el interior de las células micósicas.

6) Clasificamos 42 cepas de bacilos resultantes de la transformación de mohos y levaduras; describimos su ecología.

7) Modificamos tres de las técnicas empleadas en la clasificación.

8) Transformamos siete cepas de bacilos Megatherium y estudiamos su morfología.

9) Describimos el modo de realizarse la transformación con datos observados en microcultivos y en el microscopio de fase.

10) Señalamos un posible antecedente de transformación del bacilo en uno de los trabajos del Prof. Knaysi, aunque no lo interpretó como nosotros.

11) Hacemos un breve resumen de los estudios morfológicos realizados por investigadores actuales.

12) Llegamos a la conclusión de que el Megatherium no debe considerarse como una especie bacteriana, sino como una fase intermedia entre los mohos y las bacterias, y defendemos la existencia de un ciclo vital que une a estos organismos, cuya fase intermedia es este bacilo.

BIBLIOGRAFIA

(1) **MULLER, O. F.:** Vermium terrestrium et fluviatilium..., Hauniae et Lipsiae. 2 vols. (1773-4). Animalcula infusoria et marina..., Hauniae, pp. 367, 50 pl. (1786).

(2) **EHRENBERG, C. C.:** Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen. Leipz., Text pp. 547, **Atlas,** 1838-64 pl. (1838).

(3) **DUJARDIN, F.:** Hist. naturelle des zoophyt..., pp. 684 (1841).

(4) **COHN, F.:** Nov. act. Acad. Caes. Leop-Carol. nat. curios. Vratislav. u. Bonnae, 24, 101-256.6 pl. (1854).

Las cuatro citas anteriores se han tomado: **F. W. ANDREWS, J. A. ARKWIGHT:** A system of Bacteriology in relation to medicine, vol. I, London, 1930.

(5) **COHN, F.:** Beitrage zur Biologie der Pflanzen, vol. I, part. 3. Kern, Breslau (1875).

(6) **RAY-LANKESTER, E.: Quart. Jour. Micr. Sci.** On a peach-coloured bacterium-Bacterium rubescens, 13 (new series): 408-

425 (1873); Further observations on a peach -or red-coloured bacterium-Bacterium rubescens, 16 (new series): 27-40 (1876).

(7) **WARMING, E.:** Om nogle ved Danmarks Kyster zevende Bakterier Videnkabelige Meddelelser Kopenhagen (1875), núm. 20-28, p. 3-116. French abstract (1876), p. 1-36.

Las tres últimas citas se han tomado de la obra de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol. París, 1949.

(8) **PASTEUR:** Etude sur la bière (1876). Obras de Pasteur, t. II-V.

(9) **NAEGELI, C.: Bot. Ztg.,** t. 15, 76 (1857).

(10) **NAEGELI, C.:** Die niederen Pilze. R. Oldenbourg Munchen, p. 1-285 (1875). Cita tomada de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol. París, 1949.

(11) **ZOPF, W.:** Die Spaltilze. Edward Tremendt, Breslau (1833). Cita tomada de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol. París, 1949.

(12) **WINOGRADSKI, S.: Bot. Ztg.** 45, pp. 489, 513, 529, 545 et seq. Cita tomada de **F. W. ANDREWS; J. A. ARKWRIGHT.** A system of Bacteriology in relation to medicine, vol. I. London, 1930.

(13) **WINOGRADSKY, S.: Ann. Inst. Pasteur,** 3, 249 (1889).

(14) **METCHNIKOFF, E.: Ann. Inst. Pasteur,** 3, 61-68 (1889).

(15) **JORGENSEN, A.:** Der Ursprung der weinhefen. **Cent. Bakt.** 321-26 (1889).

(16) **JORGENSEN, A.:** Lab. von Jörgensen. Copenhagen, 1, 1895. **Cent. Bakt.** II, 825 (1895).

(17) **SOREL:** Etude sur l'Aspergilus oryzae. Comp. Rend. Acad. Scienc. 121 (1895). Cita tomada de **GUILLERMOND, A.** «The Yeasts». John Wiley and Sons, Inc. New York (1920).

(18) **KLOCKER, A., SCHIONING, H.:** Que savons-nous sur l'origine des Saccharomyceten. C. R. du Lab. de Carlsberg. 55 (1895). Cita tomada de la última obra nombrada: «The Yeasts».

(19) **SEITER, O.:** Studien über die Abstammung der Saccharomyceten. **Cent. f. Bakt.** II, 301-307 (1896).

(20) **VIALA, P., PACOTTET:** Nouvelles recherches sur l'anthracnose. **Rev. de Viticulture** (1905).

(21) **VIALA, P., PACOTTET:** Levures et kistes des Gloesporium. **Ann. Inst. Agr.** 5 (1906).

Las citas 20 y 21 se han tomado de la obra «The Yeasts».

(22) **GUILLERMOND, A.:** A propos de l'origine des levures. **Ann. Mycologyci.** 5, 49-69 (1907).

(23) **GUILLERMOND, A.:** Recherches sur le développement du G l. n e r v i s e q u u m et sur sa prétendue transformations en levures. **Rev. gen. Botanique.** 20, p. 385 (1908).

(24) **LOHNIS, F., HANZAWA, J.:** Die Stellung von Azotobakter in System. **Centbl. Bakt.** II, 42, 1-8 (1914).

(25) **LOHNIS, F., SMITH, N. R.:** Life cycles of the bacteria. **Jour. Agr. Res.,** 6: 675-702 (1916).

(26) **LOHNIS, F.:** Studies upon the life cycles of the bacteria. **Mem. Nat. Acad. Sci.,** 16. Second memoir: 1-335 (1921).

25, 26. Citas tomadas de **SOCIAS, A.:** Un ciclo vital en el P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a. **Anl. I. E. de Edafología.,** t. V, v. II (1946).

(27) **JONES, D. H.: Jour. Bact.,** 325, 5 (1920).

(28) **BEWLEY, W. F., HUTCHINSON, H. B.: J. Agric. Sci.,** 144, t. 10 (1920). Cita tomada de **TOPEY, WILSON** y **MILES:** «Bacteriología e Inmunidad», segunda edición. Salvat (1949).

(29) **LEWIS, I. M.:** Cell. inclusions and the life cycle of rhizobia. **J. Bact,** t. 35, 573 (1938).

(30) **LOHNIS, SMITH.: J. Agr. Res.** 23-401 (1923).

(31) **THORNTON** y **GANGULEE: Proc. Roy. Soc.** 99, 427 (1926).

(32) **FONTES, A.: Mem. Inst. Osw. Cruz.** t. 2, 141 (1910).

(33) **FONTES, A.: Mem. Inst. Osw. Cruz.** t. 15, 181 (1923). Las citas números 30, 31, 32 y 33 se tomaron del trabajo de **SOCIAS, A.:** Un ciclo vital en el P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a.

(34) **VAUDREMER, A.: C. R. Soc. Biol. Paris.** t. 89, 19 y 74 (1923).

(35) **HAUDUROY, D., VAUDREMER, A.: C. R. Soc. Biol. Paris.** t. 89, 1.276 (1923).

(36) **VALTIS, JEAN: C. R. Soc. Biol. Paris.** t. 90, 1.130-32 (1924).

(37) **CALMETTE, A.: Bull. Inst. Pasteur.** t. 26. 904 (1928).

(38) **FONTES, A.: Bol. Inst. Bras. Sc.** (1925). Cita tomada de **SOCIAS, A.:** Un ciclo vital en el P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a.

(39) **SWEANY, H. C.: Amer. Rev. Tuberc.,** t. 17, p. 53 (1928).

(40) **KAHN, M. C.: Tubercle.** t. 11, p. 202. Londres, 1930.

(41) **MELLON, R. R.: Jour. Bact.,** t. 11, 203-227 (1926).

(42) **NIEMEYER, L.:** Azotobakter Studien. **Bot. Arch.** 7: 363 (1924).

(43) **PETSCHENCO, B.: Centbl. Bakt.** II, t. 80, 161-2 (1930).

(44) **WILCKE, F.:** Ueber die Formenfâlle in Kulturen bei Azotobakter chroococcum. **Bot. Arch.,** t. 30, 307-343 (1930).

(45) **KRASSILNIKOW, N. A.:** The evolution of Azotobacter in conection with problem of pleomorphism. (Russian.) **Jour. Microbiol.,** t. 12: 16-30 (1931).

Las citas 42, 44 y 45 se han tomado de la obra de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol.

(46) **REGEL, S.: Centbl. Bakt.** II, t. 86, 44-68 (1932).

(47) **BACHINSKAYA, A. A.: Bul. State Inst. Agr. Microbiol.** (Russian), t. 6, 1-47 (1935). Cita tomada de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol.

(48) **DUNLOP** y **MAITLAND: Jour. Hig.,** t. 32, 238-292 (1932).

(49) **LINTON, R. W.: Bull. Off. int. Hyg. publ.,** t. 27, p. 1108-1120 (1935).

(50) **TAYLOR, J., AHUJA, M. L.: Indian J. med. Res.,** t. 23, 95-531 (1935-36).

(51) **LINTON, SEAL** y **MITRA: Indian J. med. Res.,** t. 25, 575 (1938).

Las citas 50 y 51 han sido tomadas de **TOPLEY, WILSON** y **MYLES:** Bacteriología e Inmunidad, segunda edición (1949).

(52) **STUART, HARRIS, WEELS: J. Path. Bact.,** t. 41, 408-421 (1935).

(53) **KLIENEBERGER, E.: J. Hyg.,** t. 42, 497 (1942).

(54) **DIENES, L.: J. Bact.,** t. 44, 37-74 (1942).

(55) **DAWSON** y **HOBBY:** Rat-bite. **Tr. A. Am. Physicians,** t. 54, 329 (1930). Cita tomada de **FROBISHER, Jr.:** «Elementos de Bacteriología». (1947).

(56) **HEILMAN, F. R.: J. Infect. Dis.,** t. 69, 32-45 (1941).

(57) **BROWN, T. M., NUNEMAKER, J. C.:** Rat-Bite Fever. **Bull. John Hapkins Hosp.,** 70-201 (1942). Cita tomada de **FROBISHER:** «Elementos de Bacteriología» (1947).

(58) **WARREN, J.: J. Path. Bact.,** t. 43, 211 (1942). Cita tomada de **SOCIAS, A.:** Un ciclo vital en el Pseudomonas aeruginosa.

(59) **FROBISHER, M.:** Fundamentals of Bacteriology W. B. Philadelphia y London (1945).

(60) **WINOGRADSKY, S.:** Microbiologie du sol. París (1949).

(61) **FERRAN, J.:** R. R. Acad. Sci. 1897. Idem, Barcelona, 1932.

(62) **SOCIAS, A.: Rev. de Sanidad e Hig. Publ.** XVII (1944).

(63) **SOCIAS, A.:** Un ciclo vital en el Pseudomonas aerugi-nosa. **Anal. I. Edaf.,** t. V, vol. II (1946).

(64) **DOMINGO, P., SOCIAS, A.:** Congrès International de Microbiologie. París (1932).

(65) **SOCIAS, A.:** Posible ciclo evolutivo de levadura-bacteria de un Geotrichoides. Arch. Minis. Educación Nacional (1946).

(66) **SOCIAS, A.:** Un hongo se transforma en bacteria. **Anal. Edaf.** VIII, vol. II (1946).

(67) **SOCIAS, A.:** Bacterias y mohos procedentes de folículos tracomatosos. **Microbiol. Españ.** III, 2 (1950).

(68) **SOCIAS, A., SIERRA, G.:** El factor de transformación moho-bacteria. **Microbiol. Españ.** IV, 1 (1951).

(69) **SOCIAS, A.:** De la metilación orgánica como factor de transformación moho-bacteria y su papel en la etiología microbiana del tracoma. Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología. Madrid (1951).

(70) **HEST, J. J. van: Zentralbl. Bakt.** Abt: II, t. 101: 196-223 (1907).

(71) **ENDERLEIN, G.: Arch. Entw. Gesch. der Bakt.** J. Berlín (1931).

(72) **JONAS, V.:** Wschr. Brauerei 47 (1930).

(73) **FINK, H., BERWADD, E.:** Jber. wiss. Station Brauerei in München. 1932/33. Tagesztg. Brauerei 31, 683-684 (1933).

Las citas 72 y 73 se tomaron de **SCHANDERL, H.: Zentralblat für Mikroskopische Forschung** (1951).

(74) **BALTATU, GH.: Zentralbl. Bakt.** Abt. II, 101, 196-225 (1939).

(75) **KOWOROWTZEVA, S. A.:** Referat im **Zentralbl. Bakt.** Abt. II, 102-121 (1940).

(76) **SCHANDERL, H.:** Der Züchter. 20, 314: 65-176 (1850).

(77) **SCHANDERL, H.: Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodick.** 146-157 (1951).

(78) **SMITH, R. N., GORDON, E. R., CLARK, E. F.:** Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria. **Miscellaneous Publication,** núm. 559. U. S. Department of Agriculture. Washington (1946).

(79) **AYERS, S. H., RUPP, P., JOHNSON, W. T. Jr.:** A study of the Alkali-forming Bacteria found in Milk. U. S. Dept. Agr. Bul. 788, 39 pp. illus. (1919).

(80) Society of American Bacteriologists, Committee on Bacteriological Technic. 1939. Manual of Methods for pure culture Study of bacteria. Leaflet V, test for the descriptive chart. 8 pp. Geneva, N. Y.

(81) **O'MEARA, R. A. Q.: J. Path. and Bact.** 4: 401-406 (1931).

Las citas 79, 80 y 81 se han tomado de **SMITH, GORDON, CLARK:**

Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria. **Misc. Publ.**, núm. 559. U. S. Dep. of Agr. Washington (1946).

(82) **BERGEY:** Manual of determinative Bacteriology, 5th ed. William & Wilkins Co. Baltimore (1939).

(83) **TOPLEY y WILSON:** Bacteriología e Inmunidad, 2.ª edición, t. 1 (1949).

(84) **ZOPF, W.:** Die Spaltplize. Ed. 3, 127 pp. illus. Breslau. Cita tomada de **SMITH, GORDON, CLARK:** Aerobic Mesophilic Sporeforming Bacteria. **Mis. Publ.** 559. U. S. Dep. Agr. Washington (1946).

(85) **RETTGER** and **GUILLESPIE:** Bacterial variation. **J. Bact.**, t. 23, 15-17 (1932).

(86) **KNAYSI, G.:** Morfological and cultural studio of bacillus Megatherium with special reference to dissociation. **J. Bact.**, t. 26, 623-44 (1933).

(87) **HADELY, P.:** Microbic dissociation. **J. Infect. Dis.**, t. 40, 1-312 (1927). Cita tomada del trabajo de **KNAYSI: J. Bact.**, t. 26, 623-44 (1933).

(88) **KNAYSI, G.:** Further observations on certain variants of bacillus Megatherium. **J. Bact.**, t. 29, 389 (1935).

(89) **SMITH, A. O.** y colaboradores: Some effects of salt the morphology of bacillus Megatherium. **J. Bact.**, t. 25, 49 (1933).

(90) **BAYNE-JONES, S., PETRILLI, A.:** Cytological changes during the formation of the endospore in bacillus Megatherium. **J. Bact.**, t. 25, 261 (1933).

(91) **WUND, M.: Zentralblt. f. Bakt.** I Abt., t. 42, 673-688 (1906).

(92) **RETTGER, L. F., GUILLESPIE, H. B.: J. Bact.**, t. 26, 289-312 (1933).

(93) **RETTGER, L. F., GUILLESPIE, H. B.: J. Bact.**, t. 30, 213-231 (1935).

(94) **WYCKOFF, RALPH, W. G.:** The morfology of bacterium shigare cultivated on various media favorable to the development of filterability and life cycle forms. **J. Exper. Med.**, t. 57, 165-180 (1933).

(95) **RALPH** and **WYCKOFF: J. Exper. Med.**, t. 59, 381-392 (1934).

(96) **LEWIS, I. M.: J. Bact.**, t. 24, 381-414 (1932).

(97) **GUILLESPIE** and **RETTGER: J. Bact.**, t. 29, 41-52 (1935).

(98) **GUILLESPIE** and **RETTGER: J. Bact.**, t. 38, 41-52 (1939).

(99) **JAY, P.: J. Path. Bact.**, t. 40, 93-105 (1928). Cita tomada de la anterior.

(100) **MEISSNER, H. MEYN. A.** and **SCHOOP, G.: Zentr. Bakt. Parasitenk.**, t. 120, 257-290 (I Abt.) (1931).

(101) **KUHNP** y **STERNBEG, K.,** Ueber Bakterium und Pettenkoferien. **Zentr. Bakt. Parasitenk.,** I Abt., t. 121, 131-61 (1931).

(102) **GUILLESPIE** and **RETTGER: J. Bact.,** t. 33, 19-20 (1937).

(103) **WARDEN, C. C., CONNELL, J. T., HOLLY, L. E.: J. Bact.,** t. 6 (1921).

(104) **DUBIN** y **SHARP:** Comparison of the morphology of bacillus Megatherium with LigII and electron microscopy. **J. Bact.,** t. 48, 313 (1944).

(105) **WELSHIMER** and **ROBINSON: J. Bact.,** t. 57, 489-99 (1944).

(106) **KNAYSI** y **HILLIER: J. Bact.,** t. 57, 23-29 (1949).

(107) **GRELET: Ann. Inst. Pasteur,** t. 78, 423 (1950).

(108) **LWOFF** y **GUTMANN: Ann. Inst. Pasteur.**

(109) **CLARKE, A. N.: J. Bact.,** t. 63, 187 (1952).

(110) **CLARKE** y **COWLES: J. Bact.,** t. 63, 177 (1952).

(111) **WELSHIMER, J. H.: J. Bact.,** t. 61, 153 (1951).

(112) **DELAMATER** y **HUNTER: J .Bact.,** t. 63, 13 (1952).

(113) **HUNTER** y **DELAMATER: J. Bact.,** t. 63, 23 (1952).

(114) **FRAZIER, W. C.: J. Infect. Dis.,** t. 39, 302-9 (1926). Cita tomada del trabajo correspondiente a la 78.

(115) **KELLERMAN** y **McBETH: Zentb. f. Bakt.** Abt. II, t. 34, 485-94 (1912).

(116) **TREADWELL, F. P.:** Química analítica, 2 tomos. Ed. Manuel Marín. Barcelona (1947).

(117) **COHN, F.: Cohn's Beitr. Biol. Plfanz.,** t. 4, núm. 2, p. 175 (1875 a). Ibid., t. 2, núm. 3 (1875 b). Cita tomada de **WINOGRADSKY:** Microbiologie du sol. París (1949).

(118) **CHESTER, F. D.:** Del. Agr. Exp. Sta. Ann. Rpt. 42-96 (1903). Cita tomada del trabajo numerado con el 78.

(119) **TREVISAN, V. B. A.:** I generi e l'especie delle batteriacee. 33 pp. Milán (1899). Cita tomada del trabajo núm. 78.

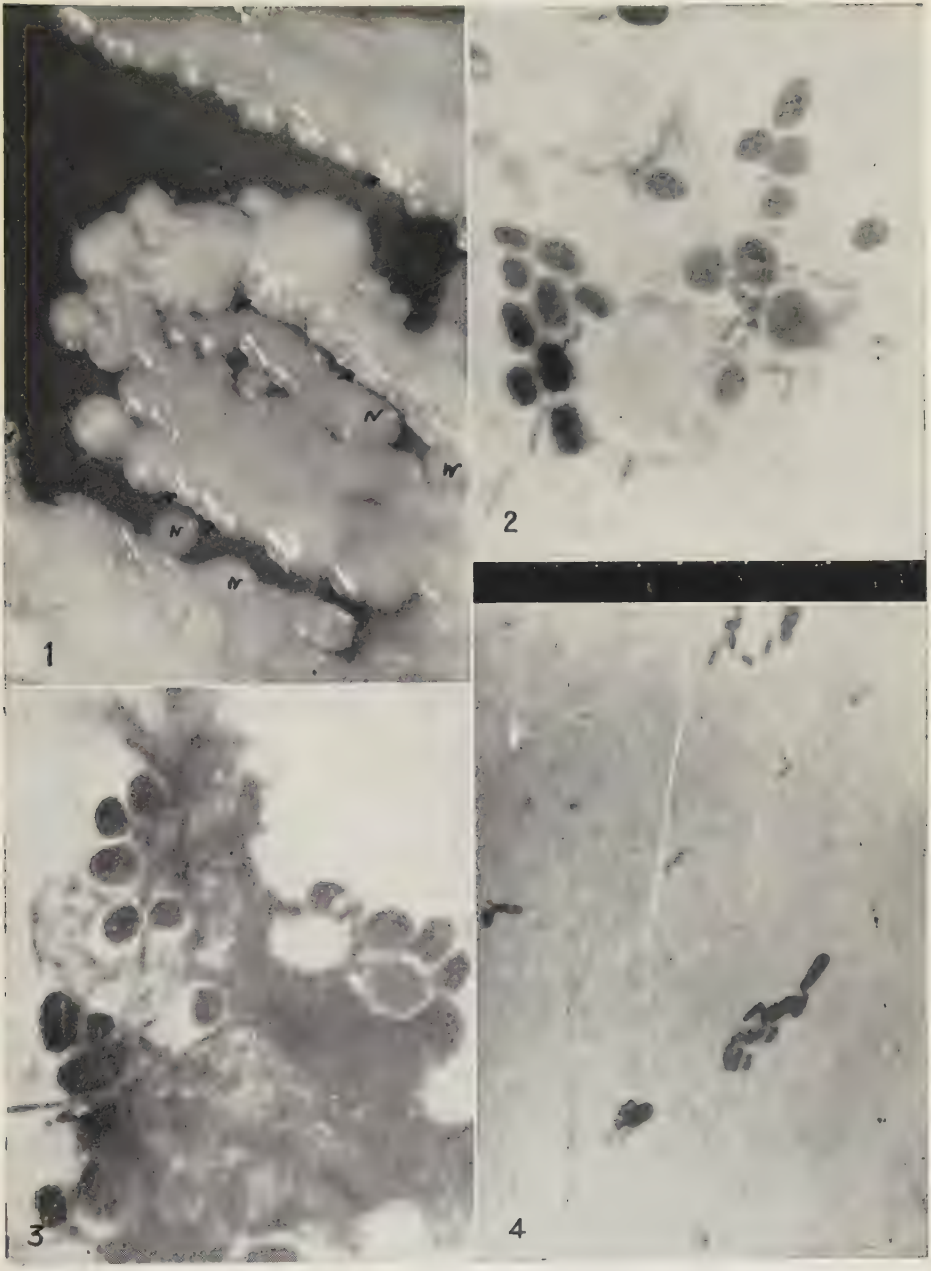
(120) **LAWRENCE** y **FORD.: J. Bact.,** t. 1, 273-316 (1916). Cita tomada del trabajo núm. 78.

(121) **CONN, H. J.: J. Infect. Dis.,** t. 46, p. 341 (1930).

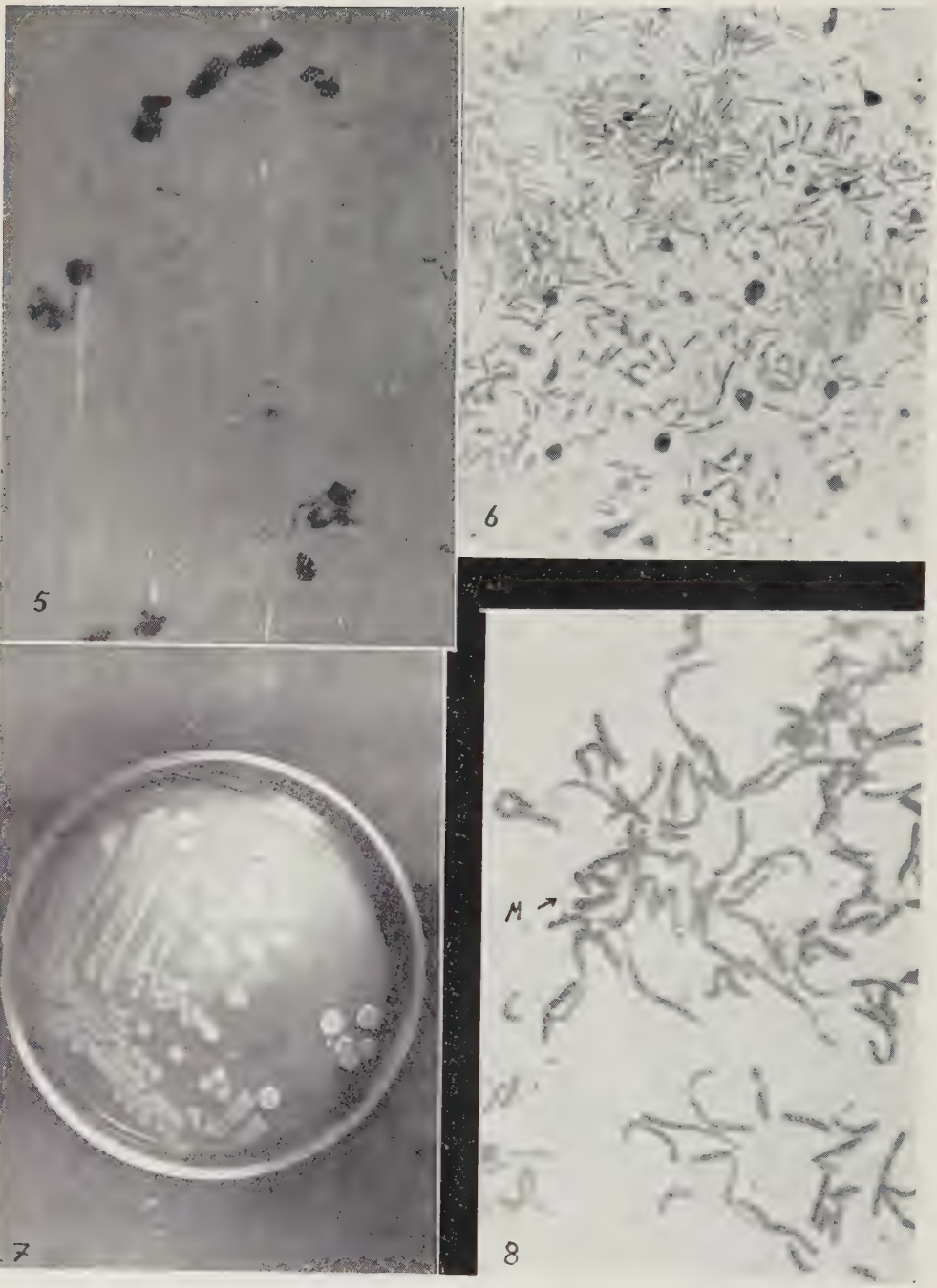
(122) **ST. JOHN-BROOKS** y **BREED, R. S.: J. Bact.,** t. 33, 445-447 (1937).

(123) **SOULE, M. H.: J. Infect. Dis.,** t. 42, 93 (1928); Ibid., t. 51, 191 (1932). Cita tomada del trabajo núm. 83.

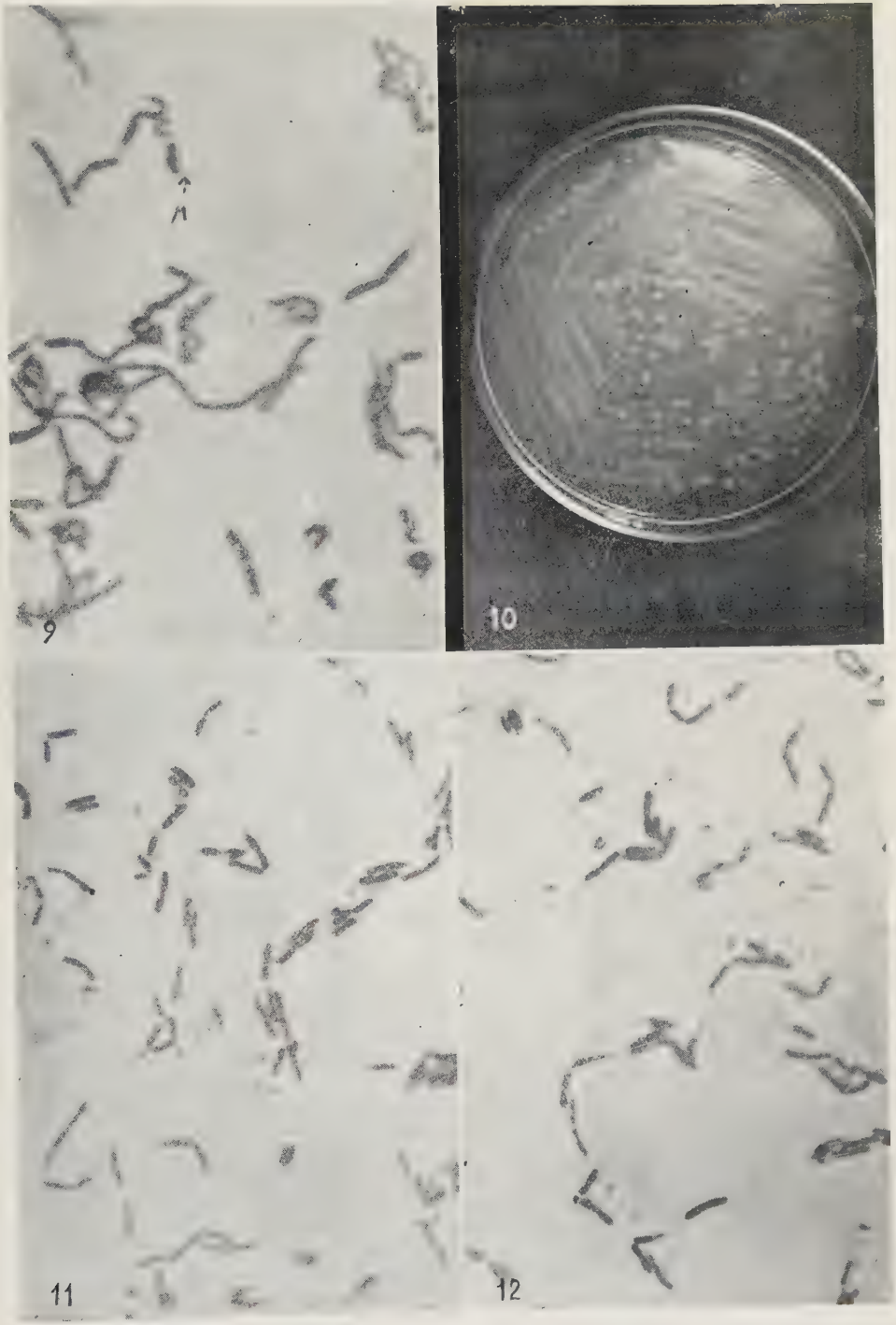
(124) GORDON, SMITH y CLARK: J. Bact., t. 43, 55 (1942).
(125) CLARK y SMITH: J. Bact., t. 37, 277-84 (1939).
(126) LAMANNA, C.: J. Infect. Dis., t. 67, 193-205 (1940).
(127) LAMANNA, C.: J. Bact., t. 44, 611-17 (1942).
(128) LAMANNA, C.: J. Bact., t. 40, 347-361 (1940).
(129) KNAYSI, C., y GUNSALUS, I. C.: J. Bact., t. 47, 381-9 (1944).



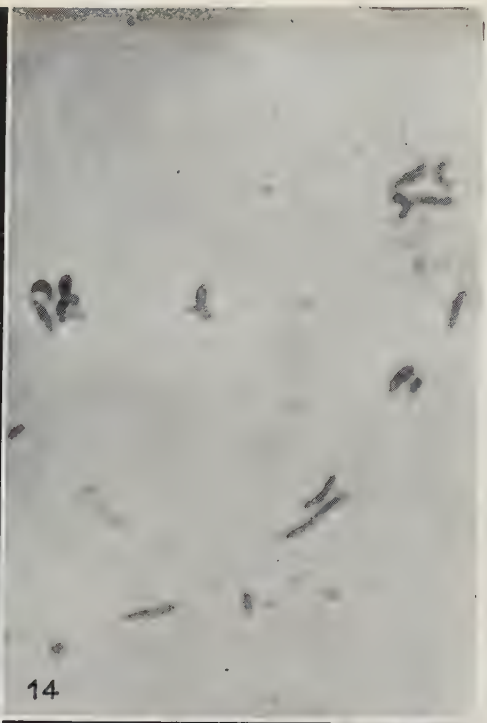
Microfotografía núm. 1.—Lev. 28 en medio A. IV. Las colonias normales están señaladas con la letra N; las flechas señalan la base de las colonias que empiezan a transformarse.—Microfotografía núm. 2. Bacilos procedentes de una de las colonias señaladas por las flechas. Levaduras deshechas, abundantes granulaciones fuera de la membrana y bacilos resultantes de la transformación. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 3.—Lev. 9 a las treinta horas de transformarse en el medio A. IV. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 4.—Lev. 18 en medio A. IV. Se ven formas intermedias entre levadura y bacilo y las dos especies de bacilos que resultan de la transformación, megatherium *y* subtilis. *Tinción de May-Grünwald.*

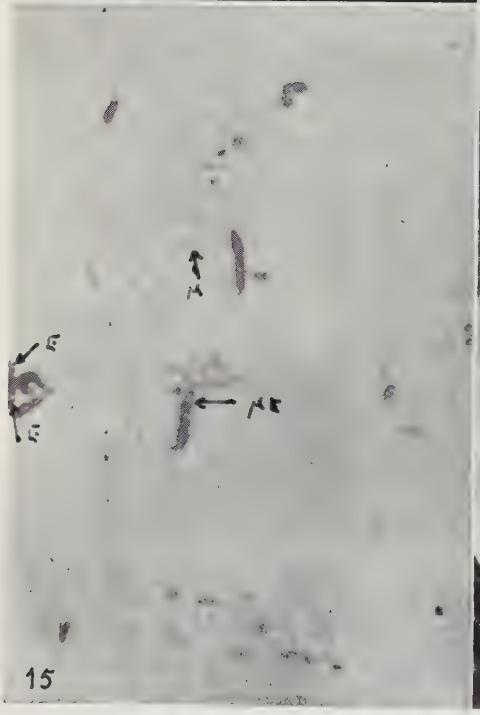


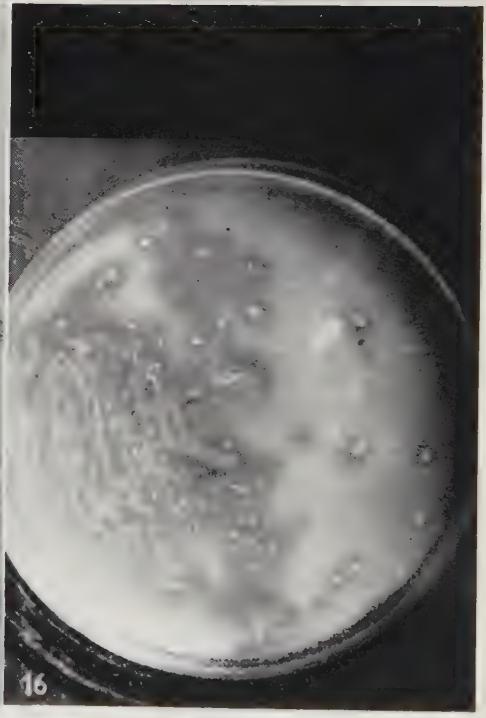
Microfotografía núm. 5.—Lev. núm. 7 cultivada en el medio anterior.—Microfotografía núm 6. Transformación de la lev. 6 en el medio A. III. con SH_2. *Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 7.—Bacilo* megatherium *en agar nutricio glucosado.—Microfotografía núm. 8.—Bacilo* megatherium *procedente de una de las colonias de la placa de agar nutricio glucosado. Tinción de May-Grünwald.*



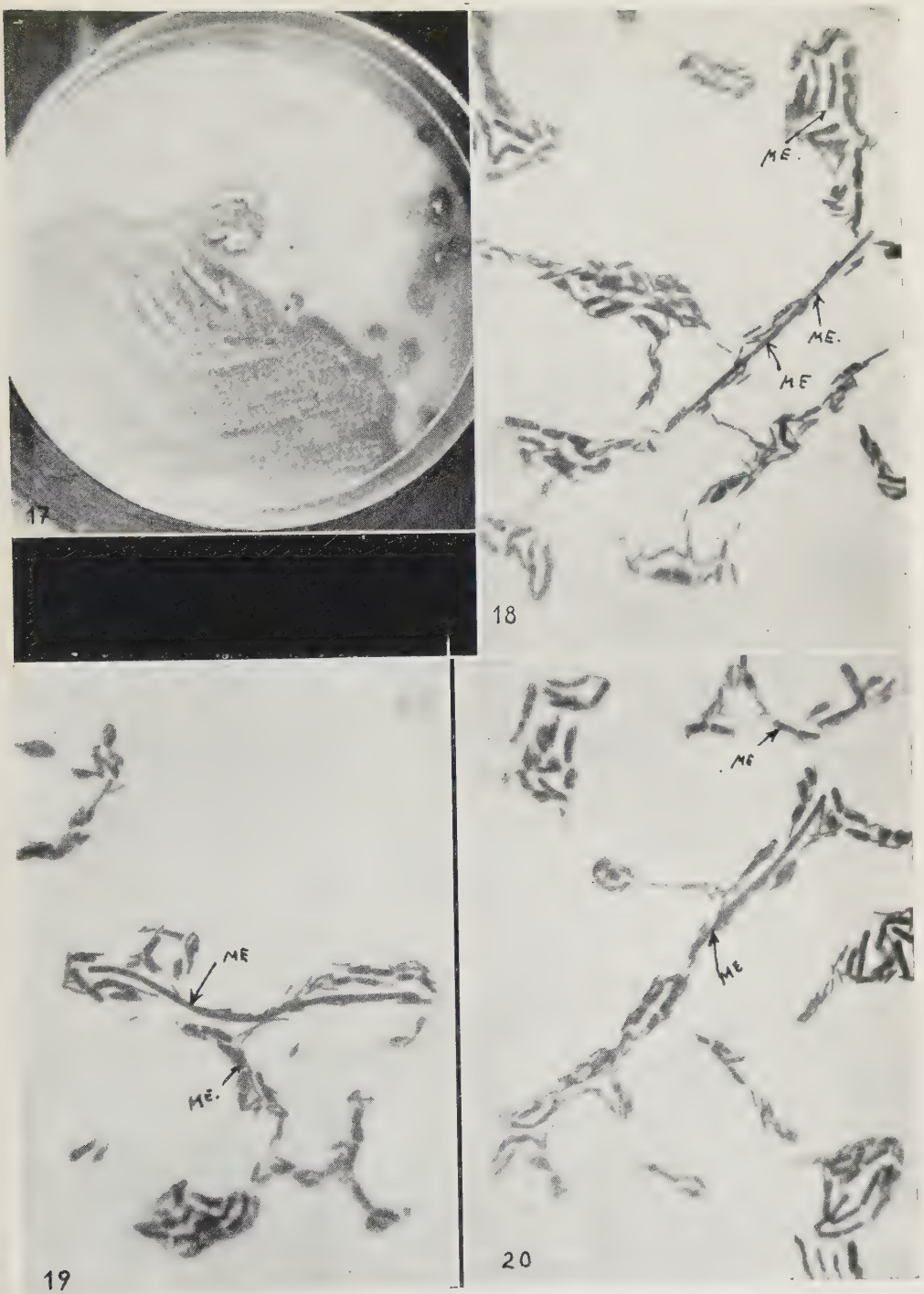
Microfotografía núm. 9.—Lo mismo que la anterior.—Microfotografía núm. 10.—Colonias del bacilo megatherium *en placas de agar nutricio.—Microfotografía núm. 11.—Bacilos procedentes de agar nutricio. Tinción de May-Gründwald.—Microfotografía núm. 12.—Otro campo de la misma preparación.*



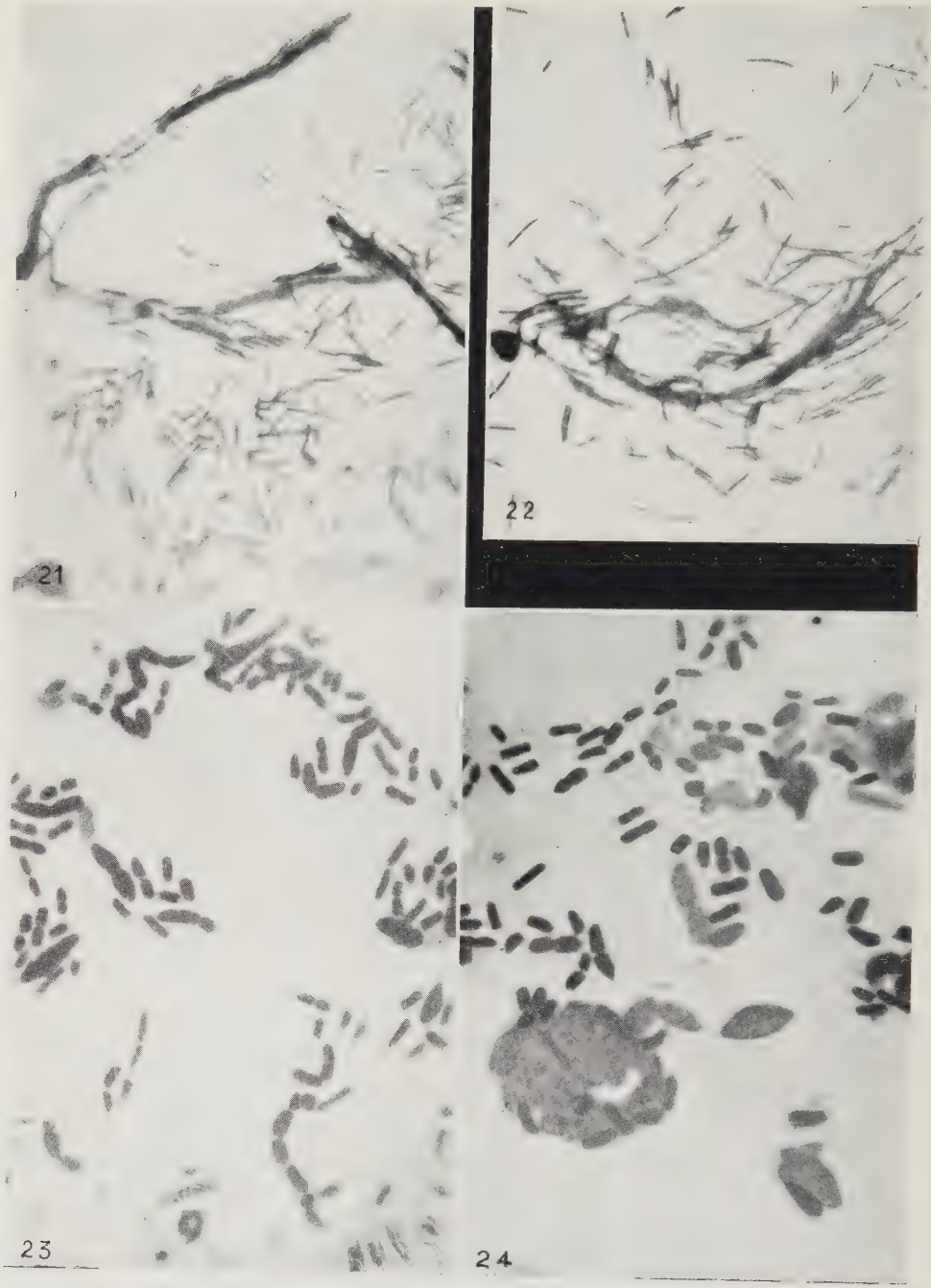




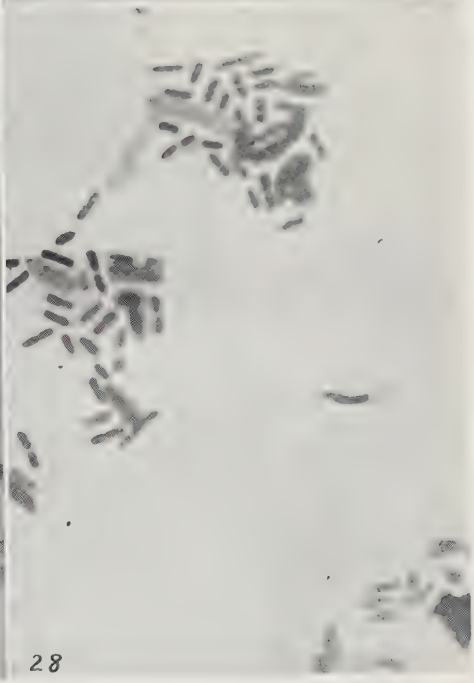
Microfotografía núm. 13.—Colonias de megatherium *en agar glucosa nitrato.—Microfotografía núm. 14.—Bacilos del cultivo anterior a los tres días de crecimiento. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 15.—Otro campo del mismo cultivo, pero a los veinte días; se ven bacilos puntiagudos y abundantes esporas.—Microfotografía núm. 16.—*Megatherium *sembrado en agar nutricio-fécula de patata para ver la hidrólisis del almidón. El halo que se aprecia en torno a las colonias indica que el hidrato de carbono se ha hidrolizado.*



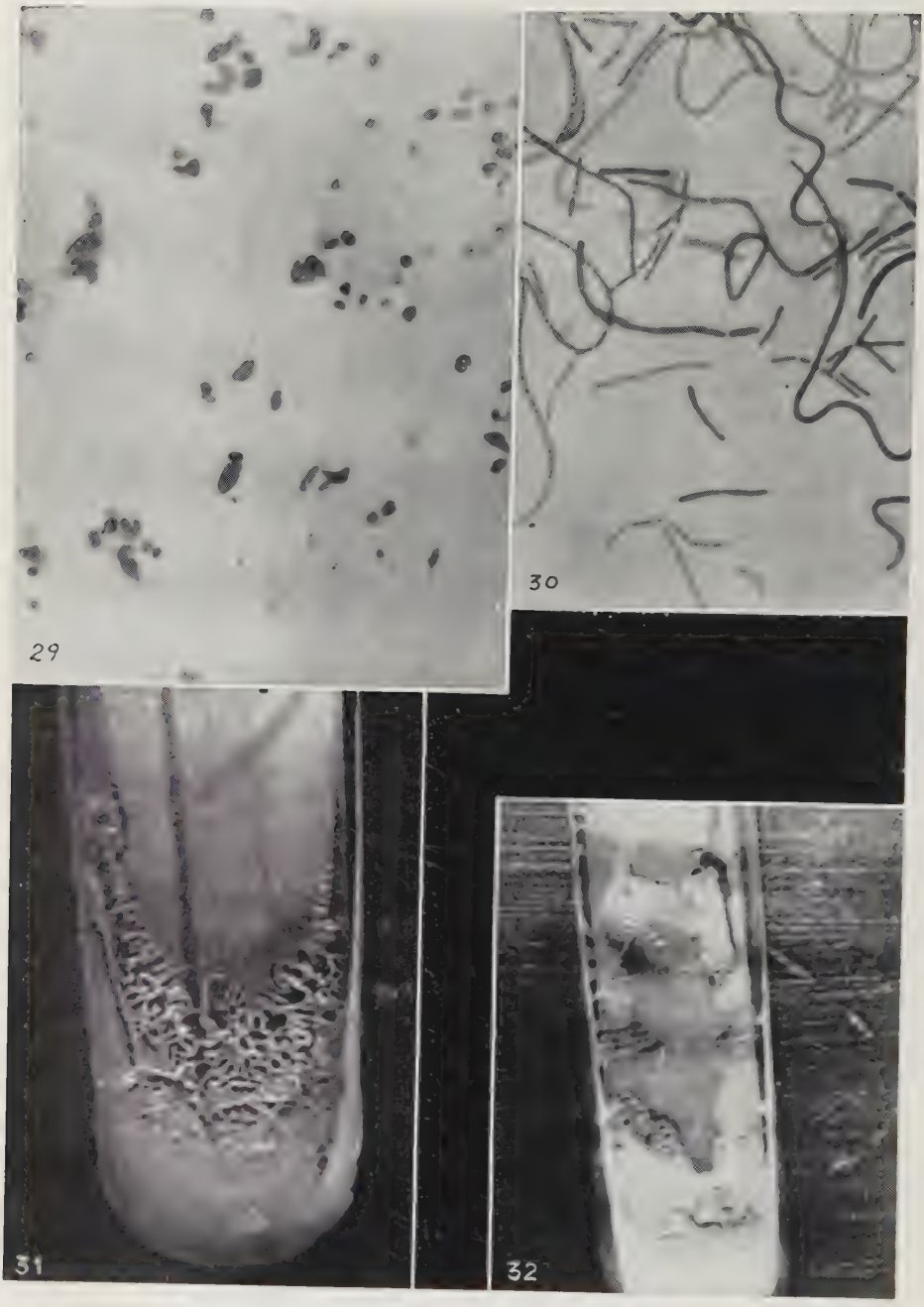
Microfotografía núm. 17.—Hidrólisis positiva de la gelatina por el bacilo megatherium.—*Microfotografía núm. 18.—Transformación del* Penicillium notatum *núm. 28 en medio A. V. En el campo microscópico vemos los dos tipos de bacilos:* megatherium *y* subtilis. *Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 19.—Otro campo microscópico de la preparación anterior.—Microfotografía núm. 20, de iguales características que la precedente.*



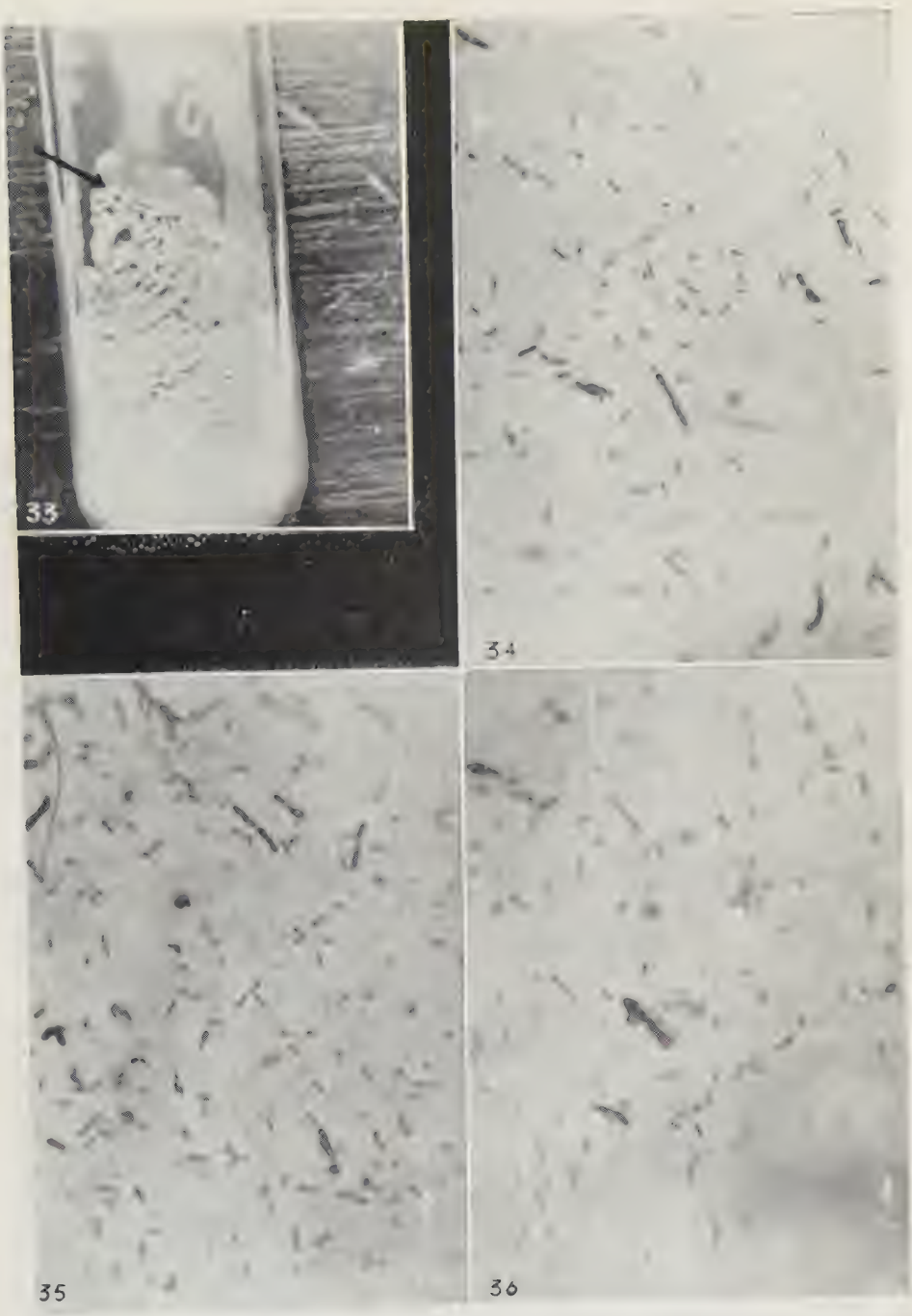
Microfotografía núm. 21.—Transformación del Penicillium notatum *núm. 23 en medio A. VI. Dentro del micelio del hongo, que está muy deshecho, se pueden ver los bacilos. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 22. –Otro campo de la misma extensión. En la parte central del trozo de micelio se distinguen un grupo de bacilos, y de los costados y extremos salen abundantes cadenas de bacterias.—Microfotografía núm. 23.—La levadura núm. 6 en un medio a base de hidrolizado de toronja, se transforma en bacilo* megatherium. *Tinción de May-Grünwald. Microfotografía núm. 24.—Igual que la precedente.*



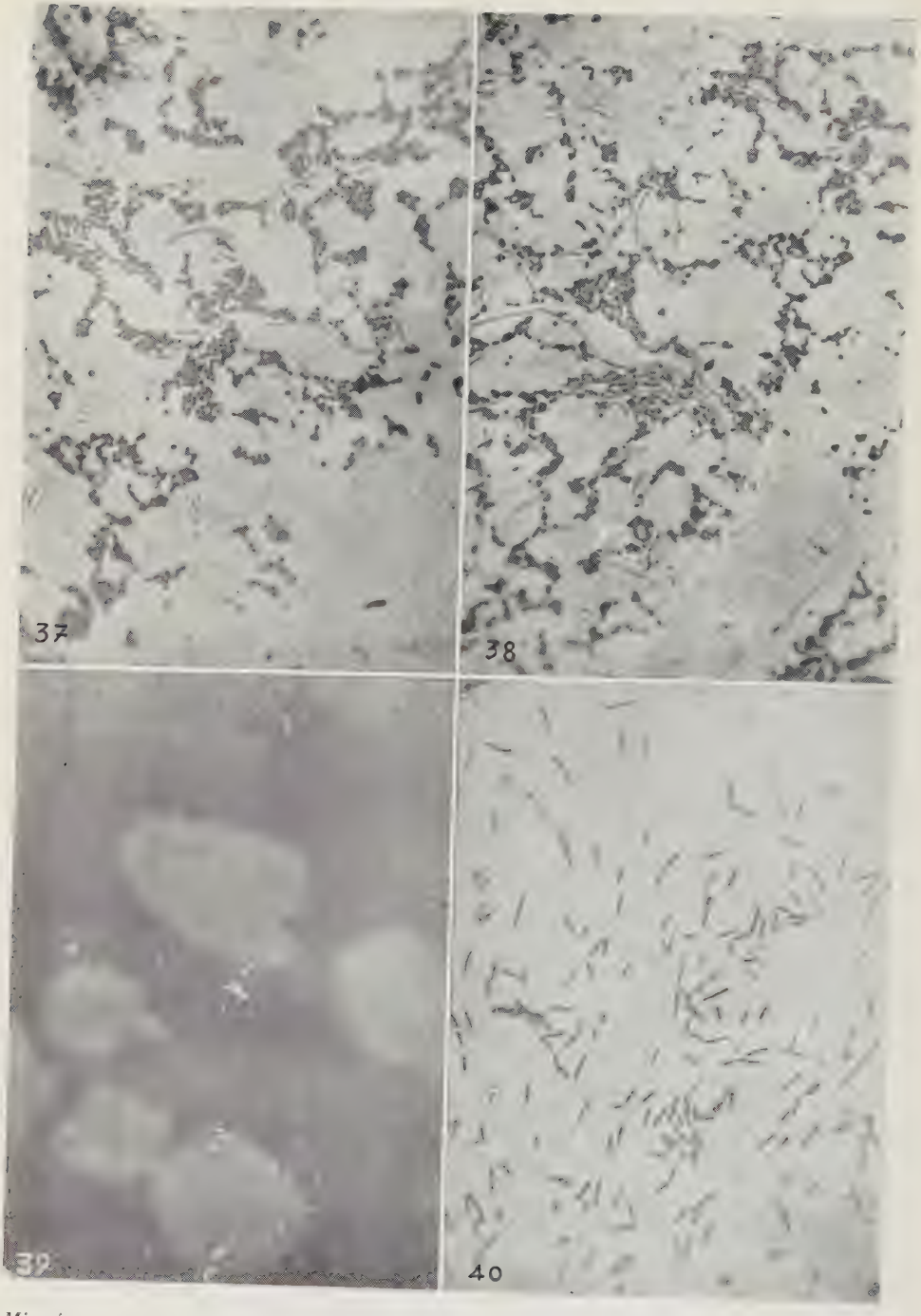
Microfotografía núm. 25.—Colonias de megatherium *en Czapek-maltosa al 3 por 100 el tubo de la derecha, y en Saboureaud, el de la izquierda.—Microfotografía núm. 26.—*Megatherium *en Czapek-maltosa a los quince días de cultivo. Los bacilos largos empiezan a arrollarse, adoptando la forma de la letra alfa. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 27.—El mismo bacilo al mes y medio de cultivo en Czapek-maltosa, se ramifica y da yemas laterales y terminales. Una de cada tipo están señaladas en la micro con las letras B y A. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 28.—*Megatherium *crecido en Saboureaud; células en sombra y globosas. Tinción de Gram.*



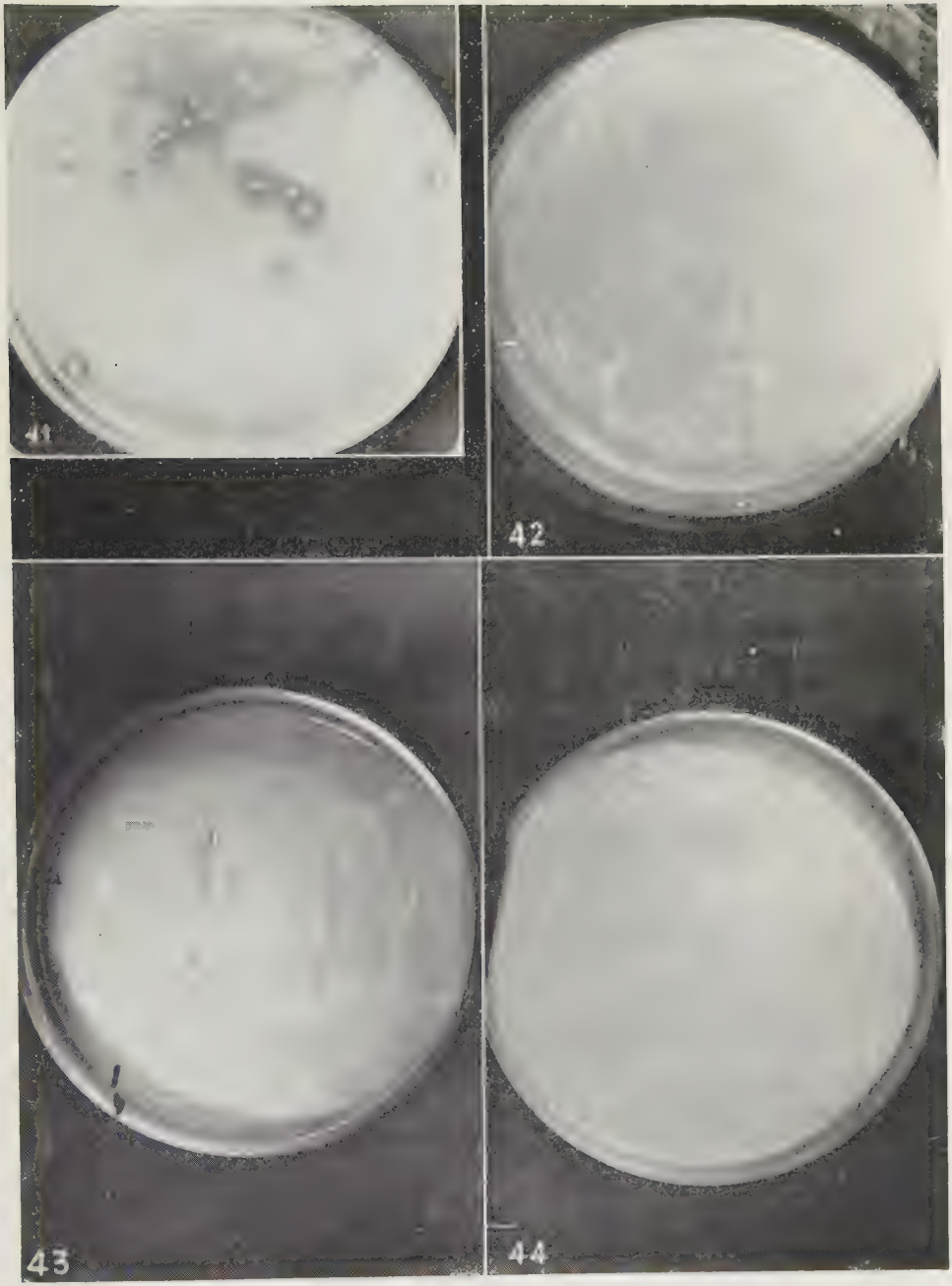
Microfotografía núm. 29.—El bacilo en Saboureaud a los dos meses de cultivo. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 30.—Megatherium *cultivado en trimetilamina. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 31.*—Megatherium *núm. 18 cultivado en medio A. IV. En el fondo del tubo el cultivo plegado indica la transformación de esta especie en el* subtilis.—*Microfotografía núm. 32. Cepa núm. 234 de* megatherium *sembrada en tubo inclinado con medio A. IV. El cultivo liso corresponde al* megatherium, *que aún no se ha transformado.*



Microfotografía núm. 33.—Megatherium *239 medio A. IV. Desde la flecha hacia arriba, las colonias son de* Megatherium; *en la parte inferior del tubo el cultivo es ya de bacilo* subtilis. *Las colonias punteadas están formadas por bacilos de las dos especies.—Microfotografía número 34.—Extensión hecha con material tomado del tubo anterior de la zona señalada por la flecha. Se ven algunos* megatherium *y numerosos* subtilis. *Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 35.—Lo mismo que la anterior.—Microfotografía núm. 36.—Con iguales características que la precedente.*



Microfotografía núm. 37.—Transformación del Aspergilus ruber *núm. 75 en micrococos y bacilo* subtilis. *Tinción de Gram. Los cocos son también Gram-positivos.—Microfotografía núm. 38.—Otro campo microscópico de la misma preparación.—Microfotografía núm. 39.—Colonias de bacilo* subtilis *en placas de agar glucosado. Son adherentes al medio y rugosas.—Microfotografía núm. 40.—Extensión hecha con bacilos de las colonias anteriores. Tinción de Gram.*



Microfotografía núm. 41.—Hidrólisis positiva de la gelatina por el bacilo subtilis.—*Microfotografía núm. 42.—Bacilo* coagulans, *sembrado en el medio con gelatina. No la hidroliza.—Microfotografía núm. 43. Hidrólisis positiva del almidón, realizada por uno de nuestros bacilos.—Microfotografía núm. 44.—Bacilo* pumilos, *que no hidroliza el almidón.*

Microfotografía núm. 45.—Bacilo subtilis *en agar glucosa nitrato. Tinción de Gram.—Microfotografía núm. 46.—Colonias del bacilo en placa del mismo medio.—Microfotografía núm. 47. Ampliación de la núm. 1.*

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

NUEVAS ESPECIES DE LEVADURAS AISLADAS DE LIQUIDOS CURTIENTES

por
Carlos Ramírez y Jacques Boidin.

PICHIA PSEUDOPOLYMORPHA NOV. SP.

Esta levadura fué aislada en la Escuela de Curtidores de Lyon (Francia), de líquido curtiente a base de corteza de castaño dulce de 6° Bé, con el número (II).

Descripción.

Sobre extracto de malta a 25° C., después de tres días, las células son ovaladas (3-6) . (4-8,5) micras, solitarias o reunidas por parejas. Forma velo fino, micodérmico, mate, que cae fácilmente al fondo del frasco, siendo reemplazado por uno nuevo.

En agar malta: a los tres días a 25° C., las células son ovaladas (3-7) . (5-10) micras, solitarias o de dos en dos. Después de un mes a 17° C., la estría es blanca, mate, de borde irregular.

Cultivo sobre porta: Se observa seudomicelio primitivo.

Esporulación: Las esporas se forman después de conjugación heterogámica (Fig. 3). Las esporas son redondas, en su mayoría cuatro por asca, con una gran gota de grasa en su interior. Se producen con facilidad sobre los medios de esporulación, sobre todo el de Starkey.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles en Madrid, el día 25 de mayo de 1953.

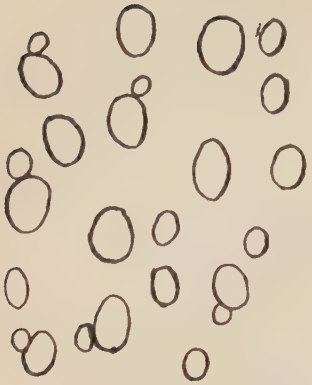


Fig. 1. — Pichia pseudopolymorpha *n. sp. Células en extracto de malta (1.000 X).*

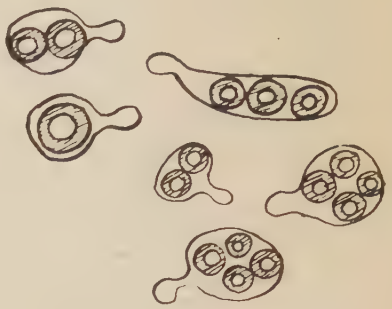


Fig. 2.—Pichia pseudopolymorpha. *Ascas en medio de Starkey, a los ocho días (1.200 X).*

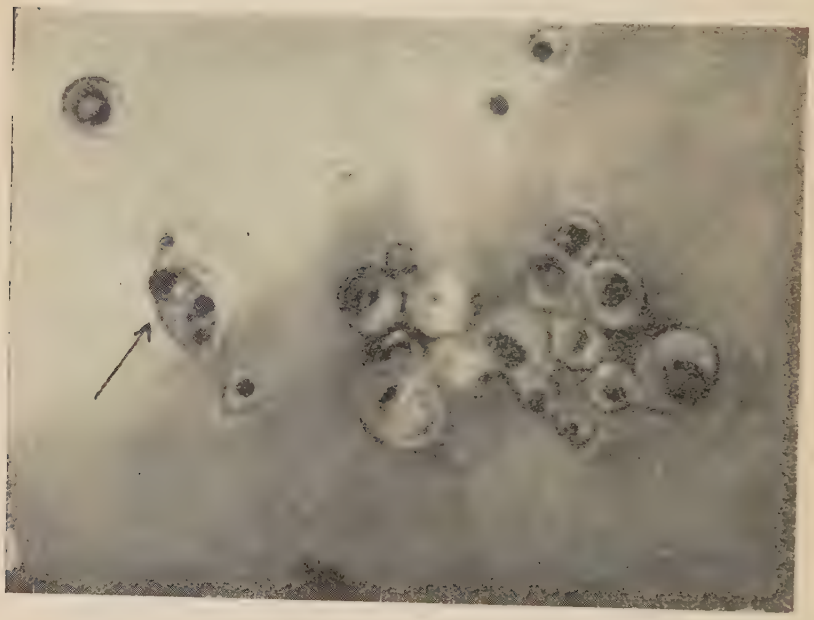


Fig. 3.—Pichia pseudopolymorpha. *La flecha señala ascosporas en las que se puede observar una gruesa gota de grasa. (Contraste de fase, 1.200 X). Las restantes células tienen gruesas gotas de grasa.*

Fermentación: Glucosa +
Galactosa + (Débil y parcial, empezando a fermentar a los cuatro días, llenando un 30 por 100 del tubo con gas.)
Sacarosa +
Maltosa + (Empieza a fermentar a los cinco días, llenando de gas la mitad del tubo.)
Lactosa —
Rafinosa + > 2/3 < 3/3.

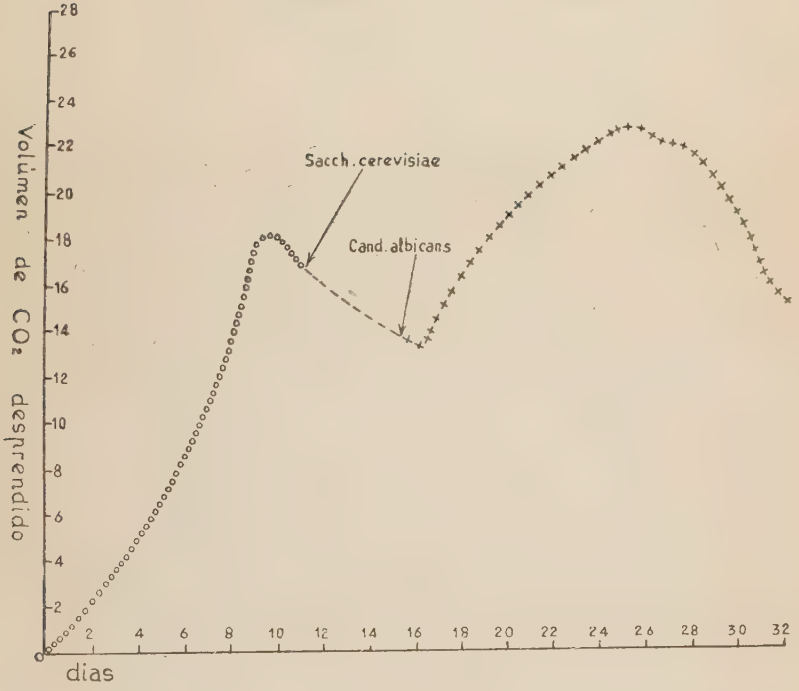


Fig. 4.—Gráfica de la fermentación de la rafinosa por Pichia pseudopolymorpha.
o o o o *Curva de la fermentación de la rafinosa por* Pichia pseudopolymorpha.
- - - - - *Curva del* Saccharomyces cerevisiae *después de inoculado.*
+++ *Curva de* Candida albicans *núm. 89, después de inoculada.*
Las flechas indican el momento de la inoculación de las levaduras añadidas.

Para poder demostrar la fermentación tan particular de la rafinosa por esta levadura se ha empleado la técnica siguiente: Después de sembrada la levadura problema en el tubo de fermentación con rafinosa, y una vez terminada su fermentación, se sembró en el mismo tubo el Saccharomyces cerevisiae, no produciendo nueva fermentación, prueba ésta de que la levadura problema había fermentado, por lo menos la fructosa integrante de la molécula de rafinosa, o sea, 1/3 de esta última. A continuación se sembró una Candida albicans (que fermenta intensamente la galactosa, pero que no posee fermento capaz de hidrolizar la melibiosa que forma parte de la molécula de rafinosa). Después de esta última inoculación se produjo nueva fermentación, de lo que se deduce que la molécula de melibiosa de la rafinosa había sido hidrolizada por la levadura problema, fermentando ésta toda la glucosa y parte de la galactosa; por tanto, más de 2/3 y menos de los 3/3 de la rafinosa. La Candida albicans fermentó el resto de galactosa que quedaba sin fermentar (*).

Asimilación de azúcares: Glucosa +
Galactosa +
Sacarosa +
Maltosa +
Lactosa +

Asimilación de nitrato potásico: negativa.
Asimilación de etanol: positiva, con formación de velo.
Hidrólisis de la arbutina: ligeramente positiva.

Por ser esporulada, multiplicarse por gemación multilateral, producir rápidamente velo micodérmico sobre extracto de malta, débil fermentación de más de un azúcar, asimilación de todos los azúcares ensayados y por la hidrólisis de la arbutina, puede incluirse este organismo dentro del género Pichia, pero por no coincidir con ninguna de las especies descritas proponemos para ella el nombre de Pichia pseudopolymorpha, por aproximarse algo a Pichia polymorpha, de la que se diferencia:

(*) Esta técnica es aplicación de una modificación introducida por uno de nosotros al método de Wickerham para determinar la fermentación de la rafinosa por las levaduras. C. Ramírez: Microbiología Española, vol. 6, núm. 3.

1.º Por la forma de las células, más cortas y ovaladas.

2.º Por fermentar intensamente la glucosa y la sacarosa, la rafinosa más de 2/3 y menos de 3/3.

3.º Por tener generalmente cuatro esporas por asca, mientras que en P. polymorpha no pasan de dos.

Diagnosis latina.

In musto maltato cellulae ovoideae (3-6) . (4-8,5), μ singulae aut binae. Post dies 3, pellicula tenuis, sicca, albida, crispulata, sursum repens.

Cultura in agaro maltato, pos unum mensem, 17º C., alba, surda, margine iregulare. Sedimentum. Pellicula facile cadet at fundum.

Pseudomycelium primitivum.

Copulatio cellularum inaequarum conformationi asci plerumque praecedit.

Ascosporae rotundae, 1-4 in asco.

Fermentatio: glucosi, galactosi (lenta et exigua), sacchari, maltosi (lenta et exigua), raffinos > 2/3 < 3/3.

In medio minerali cum glucoso, galactoso, saccharo, maltoso et lactoso crescit.

Nitras kalicus non assimilatur.

In medio minerali cum alcohole aethylico crescit; pellicula tenuis et surda formatur.

Arbutinum finditur (*).

SACCHAROMYCES RHODANENSIS NOV. SP. (**)

Este levadura ha sido aislada de líquidos curtientes en tres ocasiones distintas: la primera en l'Ecole Française de Tannerie, de Lyon, el 2-IV-47, de líquido curtiente recientemente preparado a base de corteza de castaño de 4º Baumé, con el número de orden (I bis). La segunda, con el número (12 c), fué aislada el 5-VII-47, en Oullins (Rhône) (Francia), de líquido curtiente recientemente preparado a base de Mirobolano, Quebracho y Castaño 4º Bé. La tercera, con el número (54),

(*) Esta cepa figura en la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, con el núm. 184.

(**) Esta especie está representada en la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, por dos cepas: la (12 c), con el núm. 189, y la (54), con el núm. 190.

en l'Ecole Française de Tannerie, de Lyon, el 2-III-49, de líquido a base de corteza de Mirobolano, 4° Bé.

Por ser esporulada, fermentar bien la glucosa, no asimilar los nitratos y no formar velo micodérmico, queda dentro del género Saccharomyces, pero, por sus características especiales, no encaja dentro de ninguna de las especies hasta ahora descritas. Entre las especies que sólo fermentan la glucosa y tienen esporas en forma de sombrero sólo se encuentra el Saccharomyces pastori, del que se diferencia: por asimilar la sacarosa y la maltosa, por tener seudomicelio muy desarrollado, por asimilar el etanol y por hidrolizar la arbutina. Por tanto, proponemos para ella el nombre de Saccharomyces rhodanensis.

Descripción.

En extracto de malta: A los tres días a 25° C., las células son ovaladas o redondas (3-5) . (4,5-6,5) micras, solitarias o por pares. Se forma anillo fino y sedimento.

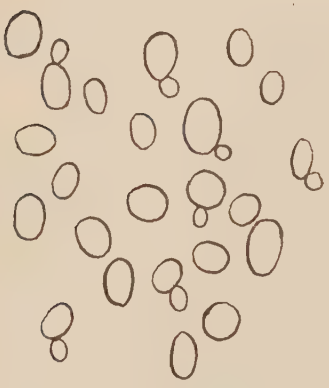


Fig. 5. — Saccharomyces rhodanensis *n. sp. Células en extracto de malta (1.000 X).*

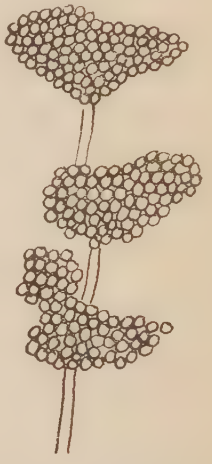


Fig. 6. — Saccharomyces rhodanensis. *Seudomicelio sobre agar-patata (650 X).*

Después de un mes a 17° C. hay sedimento, anillo fino e islotes de velo finísimo mucoso.

Desarrollo sobre agar malta: A los tres días a 25° C., células redondas a ovaladas (3-4,5) . (4-6) micras, solitarias o por parejas.

Después de un mes a 17° C. la estría es de color crema, pudiendo ser lisa o rugosa, con franjas de seudomicelio en el borde. Es brillante y mucosa.

Cultivo sobre porta: Forma seudomicelio muy desarrollado del tipo «Mycotorula». Las blastosporas, redondas u ovaladas, se disponen en racimos o en verticilos.

Esporulación: No se observan conjugaciones. Se forma 1-4 esporas en forma de sombrero por asca sobre todos los medios de esporulación.

Fermentación: Glucosa + } Maltosa —
Galactosa — } Lactosa —
Sacarosa — (Después de diez días, débil fermentación.)

Asimilación de azúcares: Glucosa + } Maltosa +
Galactosa — } Lactosa —
Sacarosa +

Asimilación de nitrato potásico: negativa.

Asimilación de etanol: negativa.

Hidrólisis de la arbutina: ligeramente positiva.

Diagnosis latina.

In musto maltato cellulae ovoideae aut rotundae (3-5) . (4,5-6,5) μ, singulae aut binae. Post dies 3, sedimentum anulusque formantur. Post unum mensem (17° C.) insulae mucosae formatur.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 17° C.) flavalbida, crispula taaut glabra, margine piloso. Mucosa.

Pseudomycelium abundat. Blastosporae verticillatae.

Ascosporae in forman petasi; 1-4 in asco.

Fermentatio glucosi, sacchari (lenta et exigua).

In medio minerali cum glucoso, saccharo, maltoso crescit.

Nitras kalicus non assimilatur.

In medio minerali cum alcohole aethylico crescit.
Arbutinum finditur.

SACCHAROMYCES STRASBOURGENSIS NOV. SP.

Este organismo ha sido aislado de manchas sobre cuero curtido, en Strasbourg en junio de 1952.

Por esporular, fermentar intensamente la glucosa, no formar velo en extracto de malta, no asimilar el nitrato potásico, encaja en el género Saccharomyces. Pero no puede ser identificado con ninguno de los Saccharomyces descritos hasta hora. Tiene muchas diferencias con el Saccharomyces pastori, al que se asemeja por las esporas en forma de sombrero, como son: 1.º, fermentar la glucosa, galactosa y sacarosa; 2.º, asimilar la glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa; 3.º, asimilar el etanol; 4.º, hidrolizar la arbutina. Del Saccharomyces rhodanensis nov. sp., anteriormente descrito, se diferencia porque este último no fermenta casi la sacarosa, no fermenta la galactosa ni la asimila. Por todo lo cual creemos tener motivos suficientes para hacer de esta levadura una especie nueva, para la que proponemos el nombre de Saccharomyces strasbourgensis.

Descripción.

Sobre extracto de malta: A 25º C., a los tres días, las cédulas son ovaladas, (4-6,5) . (5-8,5) micras, solitarias o por parejas.

Fig. 7.—Saccharomyces strasbourgensis *n. sp.*
Células en extracto de malta (1.000 X).

Sólo forma depósito. Al mes, a 17° C., además de depósito, forma anillo fino.

En agar malta: A los tres días, a 25 C., las células son ovaladas (4-7) . (6-10) micras, solitarias o de dos en dos. Después de un mes a 17° C., la estría es blanco marfil, brillante, de borde lobulado.

Cultivo sobre porta: Se observa seudomicelio, muy desarrollado en agar-malta.

Esporulación: Se observan esporas en forma de sombrero, 1-3 por asca, predominando las ascas con dos esporas. No se observan conjugaciones.

Fermentación: Glucosa +
Galactosa + (Débil.)
Sacarosa +
Maltosa —
Lactosa —
Rafinosa — ó muy débil.

Asimilación de azúcares: Glucosa +, Galactosa +, Sacarosa +, Maltosa +, Lactosa —

Asimilación de nitrato potásico: negativa.

Asimilación de etanol: moderadamente positiva, con depósito.

Hidrólisis de la arbutina: ligeramente positiva.

Diagnosis latina.

In musto maltato cellulae ovoideae (4-6,5) . (5-8,5) μ, singulae aut binae. Sedimentum formatur. Post unum mensem, 17° C., sedimentum anulusque subtilis formantur.

In agaro maltato cellulae ovoideae (4-7) . (6-10)μ, singulae aut binae. Cultura (post unum mensem, 17° C.) eburnea, nitida, glabra, margine undulato,

Pseudomycelium abundat.

Ascosporae in formam petasi; 1-3 in asco.

Fermentatio glucosi, galactosi (lenta et exigua), sacchari.

In medio minerali cum glucoso, galactoso, saccharo, maltoso crescit.

Nitras kalicus non assimilatur.

In medio minerali cum alcohole aethylico crescit.

Arbutinum finditur. (*)

BIBLIOGRAFIA

J. LODDER and N. J. W. KREGER VAN RIJ.—1952. The Yeasts.

(*) Esta especie está representada en la colección del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, por dos cepas: la (75 e), con el núm. 192, y la (75 d), con el núm. 191, las dos de idéntica procedencia, pero la (75 e) ha perdido el poder de esporular.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

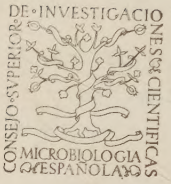
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA